

LUCIANE VIATER TURECK

**SÍNDROME METABÓLICA: INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SEUS
FATORES DE RISCO ISOLADOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

Curitiba

2015

LUCIANE VIATER TURECK

**SÍNDROME METABÓLICA: INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE SEUS
FATORES DE RISCO ISOLADOS E POLIMORFISMOS GENÉTICOS**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor (a) em Genética, no Programa de Pós Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Professora Doutora Lupe Furtado Alle

Curitiba

2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado, a qual se submeteu **LUCIANE VIATER TURECK**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 19 de março de 2015

Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutor Nina Amália Brancia Pagnan
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Cristiane Benincá
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Fabiana Antunes de Andrade
Universidade Federal do Paraná – Membro Titular

Doutora Lupe Furtado Alle
Universidade Federal do Paraná – Orientadora e Presidente da Banca

Visto



Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Prof^o Dr. Ricardo Lehtonen R. de Souza
Coordenador do PPG - GEN - UFPR
Matricula 176702

Dedicado ao meu irmão André Luiz

AGRADECIMENTOS

Agradeço a vida por ter me trazido até aqui. O caminho percorrido e as pessoas que conheci ao longo dele fazem parte do que sou hoje.

Agradeço ao “estranho tipo de sorte” que me trouxe a possibilidade de ter como orientadora uma cientista fantástica, sendo ao mesmo tempo esta pessoa maravilhosa que é. Compreendi o que é a ciência de verdade através de conversas e ensinamentos repletos de paciência, ternura e sabedoria. Muito obrigada por fazer parte da minha vida Lupe.

Obrigada a minha família, ao meu irmão André Luiz, que sempre será minha inspiração de bondade. Ao Lucas meu companheiro inseparável, sem você nada faria sentido.

Obrigada a todos os mestres que serviram de inspiração: ao Professor Euclides, Professor Ricardo, Professora Eleidi, Professora Marta Margarete, Professora Marina, Professora Maria Luiza, e a todos os demais professores do Departamento de Genética da UFPR, me sinto privilegiada por ter aprendido com vocês.

Obrigada a todas as amigas e amigos Polimórficos por ter me proporcionado dias tão agradáveis de pura amizade e alegria. Patrícia, Benn, Jovana, Meire, Gleyse, Daiane, Nalini, Luciana, Delyana, Fabi, Carla, Gabizinha, Jéssica, Anaiti, Saritha, Flávia, Amábile, obrigada! Aos amigos dos outros laboratórios e de outros departamentos: Ana Cláudia, Ju, Angela, Aliandra, Carol, Tay, obrigada!

Obrigada a Universidade Federal do Paraná por ser minha segunda casa por todos estes anos. Obrigada a CAPES pelas bolsas de doutorado.

É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na Primavera o que se vira no Verão, ver de dia o que se viu de noite, com Sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava.

José de Souza Saramago (1994)

RESUMO

A síndrome metabólica (SMet) compreende vários distúrbios endócrinos cujas vias contribuem para o aparecimento de doenças cardiovasculares (primeira causa de morte no mundo), o que a torna alvo de pesquisas e políticas de saúde pública. Identificar seus fatores de suscetibilidade é importante para a melhor compreensão da doença, possibilitando assim a aplicação de medidas de prevenção e tratamento mais eficientes. Por se tratar de uma doença complexa, são muitos os contribuintes para sua ocorrência, dentre estes, os fatores genéticos, que ganham destaque dadas as significativas taxas de recorrência familiar da mesma. O presente trabalho analisou a influência de oito SNPs (*single nucleotide polymorphism*), localizados em genes cujos produtos participam de vias do metabolismo energético (*ADIPOQ*, *ADBR2*, *ADBR3*, *GHRL*, *HSD11B1*, *PLIN4*), sobre componentes isolados da SMet, compostos por parâmetros antropométricos (índice de massa corporal (IMC), razão cintura estatura, composição corporal), bioquímicos (glicemia em jejum, insulina, HDL-C, LDL-C, TG, CT, adiponectina), e de imagem (espessura da camada de gordura visceral, espessura médio intimal da carótida), em uma amostra populacional, aparentemente saudável de trabalhadores da Universidade Federal do Paraná. As medidas antropométricas, bioquímicas e de imagem foram obtidas por métodos padronizados e seguindo protocolos adequados. Os SNPs foram genotipados pelo ensaio de discriminação alélica TaqMan (*Applied Biosystems*). As análises estatísticas incluíram a contagem direta dos genótipos, cálculo de frequência alélica, comparação de médias (parâmetros com distribuição paramétrica foram comparados por teste T, enquanto dados com distribuição não paramétrica foram comparados por teste Mann Whitney), análise de regressão múltipla e correlação de Spearman. Todos os SNPs investigados apresentaram associação com componentes isolados da SMet. Os parâmetros bioquímicos: LDL-C e CT apresentaram associação com o polimorfismo 276G>T do gene *ADIPOQ* exclusivamente em homens; enquanto que o polimorfismo rs8887 do gene *PLIN4* apresentou associação com estes mesmos parâmetros somente em mulheres, sendo que em homens este mesmo SNP foi associado aos níveis de TG. A glicemia foi associada ao polimorfismo rs12086634 do gene *HSD11B1*, e ao polimorfismo Arg16Arg do gene *ADBR2* somente entre as mulheres que compuseram o estudo, enquanto que entre os homens este parâmetro bioquímico foi associado ao polimorfismo Gln27Glu também do gene *ADBR2*. Os níveis de HDL-C foram associados ao polimorfismo rs846910 do gene *HSD11B1* entre as mulheres, enquanto que este mesmo parâmetro foi associado ao polimorfismo Trp64Trp do gene *ADBR3* em homens. Entre os fatores antropométricos e de imagem analisados, os níveis massa magra e IMC foram influenciados pelo polimorfismo Arg16Arg do gene *ADBR2* apenas nas mulheres, enquanto que a variação Gln27Glu do mesmo gene foi associada à espessura médio intimal da carótida em ambos os sexos. O polimorfismo Trp64Trp do gene *ADBR3* foi associado à espessura médio intimal da carótida somente em homens. O polimorfismo L72M do gene *GHRL* não apresentou associação dependente de gênero, sendo associado aos níveis de HDL-C na amostra geral. Verificamos que as associações entre os parâmetros de risco que compõem a SMet e os SNPs investigados foram marcadamente dependentes do gênero, sendo que estudos futuros são necessários para avaliar a possível influência dos hormônios sexuais na modulação das relações observadas.

Palavras chave: Síndrome metabólica, parâmetros antropométricos, parâmetros bioquímicos, parâmetros de imagem, polimorfismos genéticos, associação, gênero.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MetS) comprises several endocrine disorders that contribute to the onset of cardiovascular disease (the leading cause of death in the world), making it the subject of research and public health policies. Identifying your susceptibility factors is important for a better understanding of the disease, thus enabling the implementation of prevention measures and treatment more effective. Because it is a complex disease, many factors contribute to its development, among them, the genetic factors that are highlighted given the significant familial recurrence rates. This study examined the influence of eight SNPs (single nucleotide polymorphism), located in genes whose products participate in energy metabolism pathways (*ADIPOQ*, *ADRB2*, *ADRB3*, *GHRL*, *HSD11B1*, *PLIN4*) on MetS individual components, composed of anthropometric parameters (body mass index (BMI), waist height ratio, body composition), biochemical (fasting glucose, insulin, HDL-C, LDL-C, TG, TC, adiponectin), and image (thickness of visceral fat layer, mean intimal thickness of the carotid), in a population sample, workers apparently healthy of the Federal University of Paraná. The anthropometric, biochemical, and imaging measures were obtained by standard methods, following appropriate protocols. SNPs were genotyped by TaqMan allelic discrimination assay (Applied Biosystems). The statistical analysis included the direct counting of genotypes, allele frequency calculation, comparison of means (parameters with parametric distribution were compared by t test, while data with non-parametric distribution were compared by Mann Whitney test), multiple regression analysis and Spearman correlation. All investigated SNPs were associated with isolates MetS components. The biochemical parameters: LDL-C and TC were associated with the *ADIPOQ* 276G>T polymorphism exclusively in men; while the *PLIN4* rs8887 polymorphism was associated with the same parameters only in women, and in men this SNP was associated with TG levels. Blood glucose was associated with the *HSD11B1* rs12086634 polymorphism and the *ADRB2* Arg16Arg polymorphism, only among women who composed the study. Among men this biochemical parameter was associated with *ADRB2* Gln27Glu polymorphism. HDL-C levels were associated with *HSD11B1* rs846910 polymorphism among women, while the same parameter was associated with *ADRB3* Trp64Trp polymorphism in men. Between anthropometric and image factors analyzed, the lean mass and BMI were influenced by *ADRB2* Arg16Arg polymorphism only in women, while the Gln27Glu variation of the same gene was associated with carotid artery intima-media thickness in both sexes. The *ADRB3* Trp64Trp polymorphism was associated with carotid artery intima-media thickness in men only. The *GHRL* L72M polymorphism showed no gender dependent association, being associated with HDL-C levels in the general sample. The associations between the MetS risk parameters and the investigated SNPs were markedly gender dependent. Future studies are needed to evaluate the possible sex hormone influence on the modulation of the observed relationships.

Key words: Metabolic syndrome, anthropometric, biochemical, imaging parameters, genetic polymorphisms, association, gender.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - INTERRELAÇÃO ENTRE OS ELEMENTOS QUE COMPÕEM A SMET	23
FIGURA 2 - INTERAÇÕES ENTRE OS FATORES DE RISCO PARA A SMET E AS DCVs E DMT2	24
FIGURA 3 - METABOLISMO ENDÓGENO E EXÓGENO DE LIPÍDEOS	41
FIGURA 4 - DESENVOLVIMENTO DE DMT2 E COMPLICAÇÕES RELACIONADAS	45
FIGURA 5 - MECANISMOS PRÓ-HIPERTENSIVOS SUBJACENTES A SMET	48
FIGURA 6 - REAÇÕES CATABOLIZADAS PELA 11 β -HIDROXIESTERÓIDE DESIDROGENASE	52
FIGURA 7: DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA GÊNICA DE <i>HSD11B1</i>	53
FIGURA 8 – ADRENORECEPTOR BETA 2 E SEUS POLIMORFISMOS	57
FIGURA 9 – ADRENORECEPTOR BETA 3 E A POSIÇÃO DO POLIMORFISMO Trp64Arg	61
FIGURA 10 – ESQUEMA REPRESENTANDO A ESTRUTURA GÊNICA DE <i>ADIPOQ</i> E A LOCALIZAÇÃO DO POLIMORFISMO INVESTIGADO	64
FIGURA 11 – GENE <i>GHRL</i> E SEUS PROCESSAMENTOS	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS MAIS USADOS PARA A SMET	19
TABELA 2 - DISRUPTORES ENDÓCRINOS	34
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DAS LIPOPROTEÍNAS DE INTERESSE CLÍNICO	39
TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO DAS DISLIPIDEMIAS	42
TABELA 5 – NOMENCLATURA E LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PAT	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACE	- <i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
ACC	- Acetil-CoA-carboxilase
ADIPOQ	- Adiponectina
ADRB	- Proteína Relacionada com a Diferenciação Adiposa
ADBR2	- Adrenoreceptor beta 2
ADBR3	- Adrenoreceptor beta 3
AGLs	- Ácidos Graxos Livres
AGRP	- Proteínas Relacionadas a Agouti
AMPK	- Proteína Kinase Ativada-AMP
BChE	- Butirilcolinesterase
CA	- Circunferência Abdominal
CT	- Colesterol total
DAC	- Doença Arterial Coronariana
DCVs	- Doenças cardiovasculares
DMT2	- <i>Diabetes mellitus</i> do tipo 2
EGIR	- <i>European Group for the study of Insulin Resistance</i>
GH	- <i>Growth Hormone</i>
GHRL	- Grelina
GHSR	- Receptor da Grelina
GHS-R1a	- Receptor do Secretagogo do Hormônio de Crescimento
GWAS	- <i>Genome-Wide Association Study</i>
HDL -C	- <i>High Density Lipoproteins Cholesterol</i>
HLCF	- Hiperlipidemia Combinada Familiar
HOMA-IR	- <i>Homeostatic model Assessment</i>
HSD11B1	- Hidroxiesteróide (11- beta) desidrogenase
HTGF	- Hipertrigliceridemia Familiar
I-DBSM	- I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da SMet
IDF	- <i>International Diabetes Federation</i>
IGF-1	- Fator de Crescimento Insulina-Símile - 1
IMC	- Índice de massa corporal
LDL -C	- <i>Low Density Lipoproteins Cholesterol</i>
LDL-R	- Receptores de LDL
LH	- Lipase Hepática
LPL	- Lipoproteína lipase
LSH	- Lipase Sensível a Hormônios
NCEP ATP III	- <i>National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel3</i>
NHL-BI	- <i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
NQV	- Núcleo de Qualidade de Vida
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PKA	- Proteína Kinase A
PLIN 4	- Perilipina 4
PPAR	- Receptor Ativador de Proliferação de Peroxissomos
QV	- Qualidade de vida
SMet	- Síndrome Metabólica

SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAG	- Triacilglicerol
TIP-47	- Proteína de Interação de Cauda de 47kDa
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade
WHF	- <i>Word Heart Federation</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA	16
2.2 PREVALÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA	20
2.3 DINÂMICA DOS FATORES SUBJACENTES À SÍNDROME METABÓLICA	22
2.4 PRINCIPAIS DISTÚRBIOS ENDÓCRINOS QUE COMPÕEM A SÍNDROME METABÓLICA	27
2.4.1 Resistência Insulínica	27
2.4.2 Obesidade	29
2.4.2.1 Dados epidemiológicos da obesidade e parâmetros de mensuração	30
2.4.2.2 Fatores não clássicos contribuintes para a obesidade: Composição nutricional	31
2.4.2.3 Microbiota Intestinal	32
2.4.2.4 Disruptores endócrinos	33
2.4.3 Relevância metabólica do tecido adiposo	36
2.4.3.1 Metabolismo de Lipídeos	38
2.4.3.2 Dislipidemias	41
2.5 DOENÇAS RELACIONADAS À SÍNDROME METABÓLICA: <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2	43
2.5.1 Doenças cardiovasculares	47
2.6 SÍNDROME METABÓLICA E GENÉTICA	50
2.6.1 Genes Relacionados à Síndrome Metabólica contemplados neste estudo	51
2.6.1.1 Hidroxiesteróide (11- beta) desidrogenase 1 (<i>HSD11B1</i>)	51
2.6.1.2 Adrenoreceptor beta 2 (<i>ADBR2</i>)	55
2.6.1.3 Adrenoreceptor beta 3 (<i>ADBR3</i>)	59
2.6.1.4 Adiponectina (<i>ADIPOQ</i>)	62
2.6.1.5 Grelina (<i>GHRL</i>)	66
2.6.1.6 Perilipina 4 (<i>PLIN4</i>)	70
3 OBJETIVOS	75

4 JUSTIFICATIVA	76
CAPÍTULO I	78
CAPÍTULO II	93
CAPÍTULO III	117
CAPÍTULO IV	142
5 DISCUSSÃO GERAL	158
6 CONCLUSÕES	161
REFERÊNCIAS	162
APÊNDICE	197
ANEXOS	209

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SMet) pode ser compreendida como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, cujas múltiplas vias culminam em: resistência insulínica, obesidade abdominal, dislipidemias, processos inflamatórios e glicemia alterada (CIVELEK; LUSIS, 2011). A interação entre estes fatores metabólicos em desequilíbrio aumenta significativamente o risco de *diabetes mellitus* do tipo 2 e doenças cardiovasculares (ROCHE; PHILLIPS; GIBNEY, 2005). A SMet é usualmente diagnosticada pelo aumento da taxa de triglicerídeos, baixas concentrações da lipoproteína de alta densidade (HDL), altas taxas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), glicemia alterada, e acúmulo de gordura abdominal (WARODOMWICHIT; ARNETT; KABAGAMBE, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê um aumento dramático da incidência de obesidade até 2015, e paralela a esta ascensão, estará a SMet (GARCIA-RIOS *et al.*, 2011), mais frequente em obesos, mas não restrita a esse grupo, é sabidamente dependente de idade, como demonstrado em um estudo de Ford, Giles e Dietz (2002), onde: 6,7% dos indivíduos com idade entre 20-29 anos apresentaram a SMet, enquanto que no grupo com idade entre 60-69 anos a prevalência chegou a 43,5%. Além da idade, o gênero também influencia na sua incidência, sendo mais prevalente e representando maior risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares entre as mulheres (VISHRAM *et al.*, 2014).

A saúde humana deriva da interface entre fatores genéticos e ambientais, que regulam um grande número de funções endócrinas, dentre estas as vias energéticas, que quando alteradas, levam a deposição de gordura corpórea, fluxo sanguíneo alterado no sistema cardiovascular, e a resistência insulínica (RICCARDI; GIACCOB, 2004). A modulação do metabolismo energético envolve diferentes genes, bem como a interação destes com fatores ambientais, principalmente hábitos alimentares, os quais se tornaram extremamente energéticos e pouco saudáveis com o passar dos anos (RICCARDI; GIACCOB, 2004), além da inatividade física, comum no modo de vida contemporâneo (LUSIS; ATTIE; REUE, 2008).

Considerando a etiologia complexa da síndrome metabólica, definir a contribuição relativa de cada um dos fatores determinantes para sua ocorrência não é tarefa simples, uma vez que múltiplas variantes genéticas estão envolvidas, cujas interações gene-ambiente e gene-gene são extremamente complexas. Neste sentido, são vários os trabalhos que somam esforços na identificação de variantes genéticas e seu papel nesta síndrome (WILSON *et al.*, 2006; FERGUSON *et al.*, 2010; CIVELEK; LUSIS, 2011; GARCIA-RIOS *et al.*, 2011).

A fim de contribuir cientificamente para o melhor entendimento dos fatores genéticos associados à SMet, preconizou-se neste trabalho a escolha de genes candidatos com relevância funcional no metabolismo energético, além de possuírem um histórico na literatura que demonstra possíveis associações com a obesidade e/ou a fatores associados à síndrome metabólica. São eles: gene *ADRB2* (codificador do receptor beta-2 adrenérgico); gene *ADBR3* (codificador do receptor beta-3 adrenérgico); gene *HSD11B1* (codificador da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1); gene *GHRL* (codificador da grelina); gene *PLIN4* (codificador da perilipina 4) e o gene *ADIPOQ* (codificador da adiponectina).

Considerando a problemática envolvida nesta síndrome, a investigação de polimorfismos genéticos em vários genes com função direta ou indireta nas vias energéticas, em conjunto com a análise de padrões obtidos de variáveis antropométricas (peso, estatura, índice de massa corporal, circunferência abdominal, razão cintura-estatura, composição corporal), bioquímicas (glicemia, perfil lipídico, insulina, adiponectina) e de imagem (ultrassonografia intra-abdominal e ultrassonografia da espessura médio intimal da carótica), em uma amostra populacional heterogênea, e sem critérios de exclusão, podem trazer informações valiosas ainda desconhecidas, e contribuir para a construção e abertura de novos caminhos para o entendimento dos fatores subjacentes ao desenvolvimento da SMet.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA

Gerald Reaven em 1988, explicou como a resistência a captação de glicose estimulada pela insulina, e a hiperinsulinemia compensatória poderiam desempenhar importante papel na etiologia da doença arterial coronariana (DAC). Ele observou que pacientes com hipertensão apresentavam também frequentemente resistência insulínica e hiperinsulinemia, e, mesmo após tratamento com anti-hipertensivos, não exibiam redução do risco para DAC. Reaven propôs então que este efeito era devido a presença de um agrupamento de fatores de risco para a doença, secundários a resistência insulínica, além da pressão arterial elevada. A resistência insulínica é associada a hiperinsulinemia, intolerância a glicose, aumento nos níveis de triglicerídeos e diminuição nos níveis do colesterol HDL, todos estes fatores aumentam o risco para DAC. Baseado nessas observações, ele sugeriu que este conjunto de variáveis inter-relacionadas (as quais ele denominou de Síndrome X), tende a ocorrer simultaneamente em um mesmo indivíduo e pode ter grande influência na gênese da DAC (REAVEN, 1988).

Sendo assim, originalmente, o conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares foi denominado por Reaven como “Síndrome X”, sendo chamada também de “Síndrome de Resistência a Insulina” e atualmente conhecida como Síndrome Metabólica (SMet) (LUSIS; ATTIE; REUE, 2008).

A definição original da síndrome metabólica estabelece a resistência à insulina como condição fundamental para a ocorrência de uma série de distúrbios metabólicos (REAVEN, 1988), porém, não inclui a obesidade, ou a obesidade visceral como fatores de risco. Com o passar de aproximadamente duas décadas, foi esclarecido que os traços metabólicos patológicos não são condicionados exclusivamente pela resistência à insulina, mas que esta seria um componente chave para o desenvolvimento de tais patologias (BERGMAN *et al.*, 2006; DESPRES *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2008).

A síndrome metabólica pode ser compreendida atualmente como um estado inflamatório de baixo grau, resultado de uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais. A gama de fatores metabólicos alterados que constitui essa síndrome inclui: resistência insulínica; adiposidade visceral; dislipidemia; disfunção endotelial; pressão sanguínea elevada; estado de hipercoagulabilidade (KAUR, 2014). Este agregado de fatores quando presente pode predispor os indivíduos a uma mortalidade geral 1,5 vezes maior, e a mortalidade cardiovascular até 2,5 vezes maior que em indivíduos sem a síndrome (LAKKA *et al.*, 2002; HAFFNER; TAEGTMEYER, 2003).

Desde quando a síndrome foi descrita a definição dos seus fatores etiológicos é alvo de muitas reformulações e muitas críticas (FEDERSPIL *et al.*, 2006; BRIETZKE, 2007; GLUCKMAN, 2007). Apesar da indefinição dos seus critérios de diagnóstico, é certo que estudos atuais destacam interações importantes como a predisposição genética, a obesidade, hábitos de vida e o efeito benéfico da atividade física para todos os traços ligados a SMet (CAMERON; SHAW; ZIMMET, 2004; GRUNDY, 2008).

Apesar da heterogeneidade de critérios diagnósticos para a SMet, os mais usados, segundo J. Kaur (2014), são aqueles definidos pelas seguintes organizações: *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) (CLEEMAN, 2001); *World Health Organization* (WHO) (ALBERTI; ZIMMET, 1998); *European Group for the study of Insulin Resistance* (EGIR) (BALKAU; CHARLES, 1999); *International Diabetes Federation* (IDF) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: THE IDF CONSENSUS WORLDWIDE DEFINITION OF THE METABOLIC SYNDROME, 2006); e *American Association of Clinical Endocrinologists* (AACE) (EINHORN *et al.*, 2003).

Mais recentemente a *International Diabetes Federation* (IDF), *National Heart, Lung and Blood Institute* (NHL-BI), *World Heart Federation* (WHF), além de outras associações científicas, somaram esforços no sentido de “harmonizar” critérios conflitantes para a definição da SMet (ALBERTI *et al.*, 2009), no entanto a definição mais utilizada ainda é a proposta pelo NCEP ATP III. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Hipertensão, reconhecendo a importância do tema, estruturou a I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM), lançada no ano de 2005 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO *et al.*,

2005), que, adotando critérios de simplicidade e praticidade, recomenda a definição estipulada pela NCEP-ATP III. A Tabela 1 resume os principais critérios diagnósticos da SMet.

Embora exista este conflito etiológico e diagnóstico na comunidade científica, as alterações metabólicas presentes na SMet ocorrem simultaneamente com mais frequência do que seria de se esperar ao acaso, e, este conjunto de fatores aumenta o risco para doenças cardiovasculares (DCV) para além do estimado para cada fator isoladamente (REILLY; RADER, 2003). Aplicando suas variações de definições clínicas, é possível estimar que indivíduos afetados tenham risco pelo menos cinco vezes maior de desenvolver *diabetes mellitus* do tipo 2 (DMT2), e risco duplicado para o desenvolvimento de DCV (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005), sendo que quanto maior a quantidade de fatores da SMet presente, maior é o risco (ANDREADIS *et al.*, 2007).

TABELA 1 – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS MAIS USADOS PARA A SMET

Traços da SMet	WHO ⁽¹⁾	ATPIII ⁽²⁾	EGIR ⁽³⁾	AACE ⁽⁴⁾	IDF ⁽⁵⁾
Resistência insulínica	Intolerância a glicose, TGD* ou DMT2, e/ou resistência insulínica associados com dois ou mais dos seguintes fatores:	Não prevê fatores de resistência insulínica, mas 3 ou mais dos seguintes fatores:	Insulina plasmática > percentil 75 mais 2 dos seguintes fatores:	TGD ou glicemia em jejum alterada, mais qualquer um dos seguintes fatores:	Não prevê fatores de resistência insulínica
Medidas antropométricas	Relação cintura quadril >0,90 em homens, e >0,85 em mulheres, e/ou IMC > 30,0 Kg/m ²	Circunferência da cintura: Homens > 102 cm, Mulheres > 88 cm	Circunferência da cintura: Homens ≥ 94 cm, Mulheres ≥ 80 cm	IMC ≥ 25Kg/m ²	Circunferência da cintura aumentada (limiares específicos para cada população) Mais 2 fatores quaisquer:
Glicose	Resistência insulínica TGD ou DMT2	Glicemia em jejum ≥ 110 mg/dl	TGD, ou glicemia em jejum alterada (mas não diabetes)	TGD, ou glicemia em jejum alterada (mas não diabetes)	≥100mg/dl (ou diabetes)
Lipoproteínas	Triglicerídeos ≥150mg/dl e/ou HDL-C < 35mg/dl homens, e < 39mg/dl mulheres)	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl HDL-C: Homem <40mg/dl; Mulher <50mg/dl	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl e/ou HDL-C: < 39mg/dl em homens ou mulheres	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl HDL-C: Homem <40mg/dl; Mulher <50mg/dl	Triglicerídeos ≥ 150 mg/dl, ou recebendo tratamento; HDL-C: Homem <40mg/dl, Mulher <50mg/dl, ou recebendo tratamento
Pressão arterial	≥140/90mmHg	≥ 130/85 mm Hg	≥ 140/90 mm Hg, ou hipertenso tratado	≥ 130/85 mm Hg	≥130 mmHg sistólica ou ≥ 80 mmHg diastólica, ou hipertenso recebendo tratamento
Outros	Microalbuminúria 20mg/min, ou albumina: taxa creatinina ≥30mg g-1			Outros traços de resistência insulínica	

FONTE: Adaptado de J. Kaur (2014)

NOTA: *(TGD) Tolerância à glicose diminuída. (1) *World Health Organization (WHO)* (ALBERTI; ZIMMET, 1998); (2) *National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) (CLEEMAN, 2001); (3) *European Group for the study of Insulin Resistance (EGIR)* (BALKAU; CHARLES, 1999); (4) *American Association of Clinical Endocrinologists (AACE)* (EINHORN *et al.*, 2003); (5) *International Diabetes Federation (IDF)*(INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: THE IDF CONSENSUS WORLDWIDE DEFINITION OF THE METABOLIC SYNDROME, 2006).

2.2 PREVALÊNCIA DA SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica representa um dos principais problemas de saúde pública, não só devido ao aumento do risco de morbidade que ela representa em diferentes populações, mas também devido à proporção epidêmica que vem tomando (MULÈ *et al.*, 2014). De modo geral, a prevalência da síndrome metabólica vem aumentando por todo o mundo, grande parte por conta da epidemia de obesidade. O número de fatores de risco que compõe a SMet tende a aumentar com o ganho de peso e a diminuir com a perda dele (WILSON *et al.*, 1999). Cada 11 cm a mais de circunferência de cintura representa um aumento de até 80% no risco de desenvolver SMet no prazo de 5 anos (PALANIAPPAN *et al.*, 2004).

Sua incidência varia ainda de acordo com critérios como gênero, idade, etnia, ambiente rural ou urbano, com diferentes regiões tendo agrupamentos individuais de fatores de risco epidêmicos (EBERLY *et al.*, 2006; CHEUNG; THOMAS, 2007).

Estima-se que 10% a 30% da população mundial adulta possui SMet (GRUNDY, 2008). A IDF estima que um quarto da população mundial possua a síndrome (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: THE IDF CONSENSUS WORLDWIDE DEFINITION OF THE METABOLIC SYNDROME, acesso em 27/12/2014). Apesar da variação observada nos dados epidemiológicos da SMet, em parte devido a sua natureza multifatorial, já que a constituição genética, o nível de atividade física, o histórico familiar de diabetes, tabagismo, e o nível educacional influenciam em sua incidência (CAMERON; SHAW; ZIMMET, 2004), o que se sabe com consistência é que a sua prevalência é dependente da idade (GRUNDY, 2008; SCHOLZE *et al.*, 2010; SHEN; GOYAL; SPERLING, 2012; BELTRÁN-SÁNCHEZ *et al.*, 2013), com registro de aumento em norte americanos de 43,6% entre indivíduos de 60 a 69 anos e de 6,7% entre indivíduos de 20 a 29 anos entre os anos 80 e 90 (FORD; GILES; DIETZ, 2002).

O efeito do gênero sobre a prevalência da SMet também é descrito, porém, apresenta resultados conflitantes, principalmente devido a heterogeneidade de critérios diagnósticos usados. No entanto, a maioria indica uma prevalência maior entre as mulheres (GRUNDY, 2008; SCHOLZE *et al.*, 2010; SHEN; GOYAL; SPERLING, 2012; BELTRÁN-SÁNCHEZ *et al.*, 2013), sendo que entre as mulheres

pós-menopausa pode ser maior ainda, variando de 32,6% a 41,5% (PONHOLZER *et al.*, 2008).

Considerando a miscigenação ímpar, característica da população brasileira, composta por traços europeus, africanos, indígenas e latinos, é desconhecido o impacto que esta diversidade étnica, somada a diversidade ambiental brasileira, pode ter na modificação da prevalência da síndrome metabólica, ou seu impacto sobre os fatores a que ela predispõe, como o diabetes e as doenças cardiovasculares (DA SILVA *et al.*, 2005).

Em um estudo de Gronner *et al.* (2011), baseado nas definições estabelecidas pelo NCEP-ATPIII e pela IDF, analisadas ainda, as contribuições de fatores sociais em uma população urbana adulta da região sudeste do Brasil, composta por 1.116 indivíduos com idade entre 30 a 79 anos, foi encontrado que a prevalência da SMet varia de 35,9% a 43,3% de acordo com os critérios do NCEP-ATPIII e IDF, respectivamente. Baixas concentrações de HDL e pressão elevada foram as características prevalentes de acordo com os critérios do NCEP-ATPIII (76,3% e 59,2%, respectivamente). Considerando ainda os critérios de diagnóstico adotados, 13,5% dos indivíduos tinham diabetes e 9,7 tinham glicemia >100mg/dl em jejum. A prevalência da síndrome metabólica foi maior entre a população auto-declarada não branca, e significativamente associada com o aumento da idade, do IMC, e com menor nível educacional.

Em outro estudo realizado por Da Silva *et al.* (2005) com 99 adolescentes brasileiros divididos em 3 grupos (controle, acima do peso e obeso), com idades entre 10 e 19 anos, e histórico familiar de diabetes tipo 2, a prevalência da síndrome metabólica foi de 6% em todo o grupo, e nos adolescentes obesos foi de 26,1%.

Mais recentemente, Vidigal e colaboradores publicaram uma revisão sistemática da prevalência da SMet no Brasil (VIDIGAL *et al.*, 2013). Foram sistematizados os dados de dez estudos, sendo que a média ponderada das taxas gerais de prevalência da SMet, dos estudos que as mencionaram, foi de 29,6%. Baseando-se somente nos estudos com critérios do NCEP-ATPIII (2001), a média ponderada da prevalência geral da SMet foi de 28,9%, e quando ajustada para idade foi de 22%. Considerando os critérios da IDF, ajustando para gênero e idade, a média ponderada da prevalência da SMet foi de 41,3%. Considerando as populações urbanas, rurais e indígenas do Brasil, a média ponderada dos estudos

sistematizados para a prevalência da SMet foi de: 29,8%; 20,1% e 41,5%, respectivamente (VIDIGAL *et al.*, 2013). A alta incidência da síndrome entre os indígenas se deve a substituição de padrões alimentares tradicionais por hábitos alimentares mais urbanizados, além do aumento do sedentarismo nestas populações (KUHLEIN; RECEVEUR, 1996). É possível que essas mudanças, por terem chegado mais recentemente aos indígenas tenham maior impacto sobre os mesmos, uma vez que não houve tempo suficiente para que a seleção natural atuasse no sentido de eliminar variantes com efeitos deletérios frente às novas circunstâncias ambientais, e nem de fixar variantes com efeito positivo frente a este desequilíbrio energético nestas populações.

2.3 DINÂMICA DOS FATORES SUBJACENTES À SÍNDROME METABÓLICA

Os mecanismos subjacentes à síndrome metabólica não são totalmente compreendidos, no entanto, a resistência à absorção da glicose estimulada pela insulina parece modificar respostas bioquímicas de uma maneira que predispõe a vários fatores de risco metabólicos subsequentes (REAVEN 1988; DEFRONZO; FERRANNINI, 1991; FERRANNINI; HAFFNER; MITCHELL, 1991).

Os distúrbios fisiológicos da síndrome metabólica incluem obesidade abdominal, resistência à insulina, elevação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), elevação dos triglicerídeos, redução das lipoproteínas de alta densidade (HDL), hipertensão e DM2 (CIVELEK; LUSIS, 2011). Embora fatores ambientais, particularmente o excesso de calorias e a inatividade física, desempenhem papel fundamental na etiologia da SMet, alguns traços são altamente herdáveis (LUSIS; ATTIE; REUE, 2008). Estudos de associação genômicos têm demonstrado que essas características são resultado de combinações de variantes genéticas raras e comuns, cada uma das quais contribuindo com uma pequena fração para o risco (LUSIS; ATTIE; REUE, 2008).

A compreensão mais aceita atualmente sobre a síndrome metabólica é que ela constitui um fenótipo progressivo, onde alguns fatores, dentre eles a obesidade e a resistência insulínica resultam no estabelecimento da síndrome, com eventual

progressão para DMT2 e DCV em indivíduos portadores de variantes genéticas que conferem susceptibilidade (ROCHE; PHILLIPS; GIBNEY, 2005). Por conta do efeito sistêmico que a resistência insulínica apresenta, o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo são também envolvidos na patologia dessa síndrome (LE MARCHAND-BRUSTEL *et al.*, 2003).

Devido a natureza complexa das interações entre os componentes da SMet, esquemas que demonstrem uma visão mais geral acerca da sua fisiopatologia são importantes para entender sua estrutura básica. A Figura 1, adaptada de Kaur (2014), traz uma representação esquemática geral da interdependência entre estes elementos.

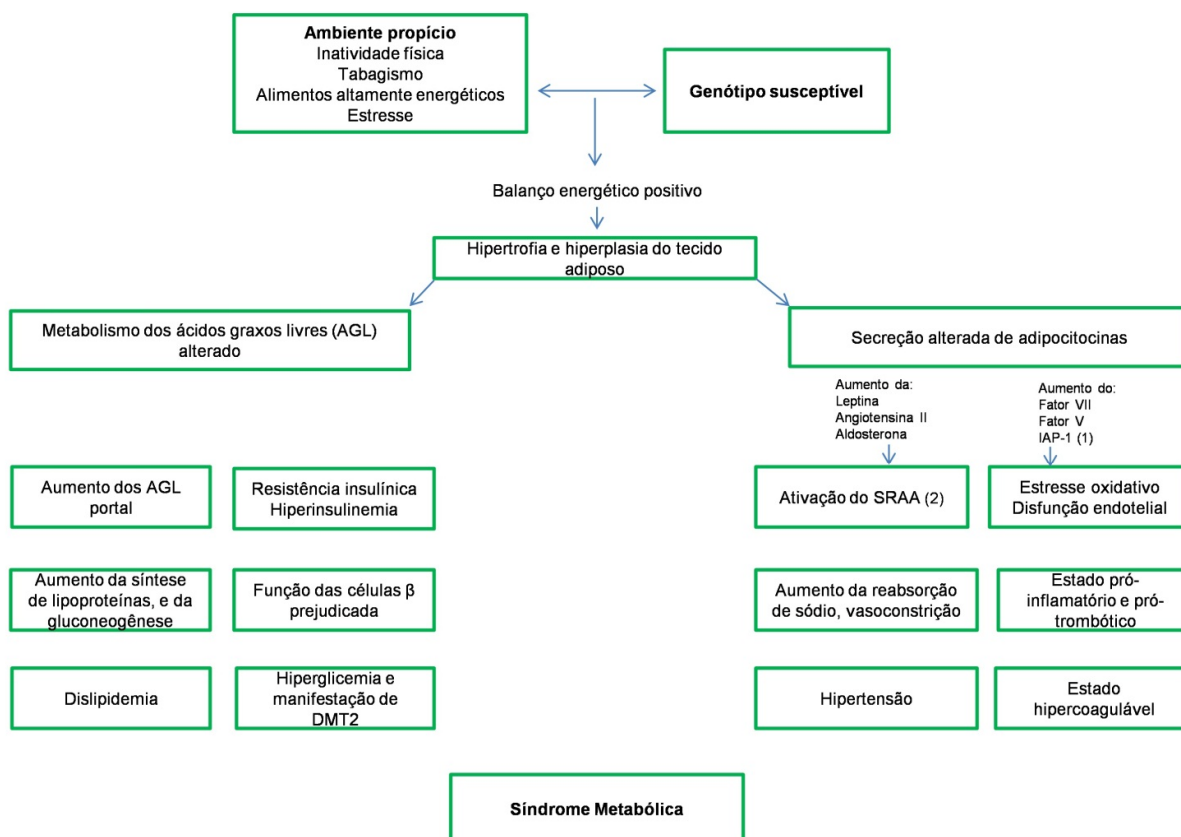


FIGURA 1 - INTERRELAÇÃO ENTRE OS ELEMENTOS QUE COMPÕEM A SMET

FONTE: Adaptado de Kaur (2014).

NOTA: (1) Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1 (IAP-1); (2) Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.

A Figura 2, adaptada de Lusi, Attie e Reue (2008), estabelece as interações mais específicas entre os fatores da síndrome metabólica com doenças cardiovasculares e diabetes.

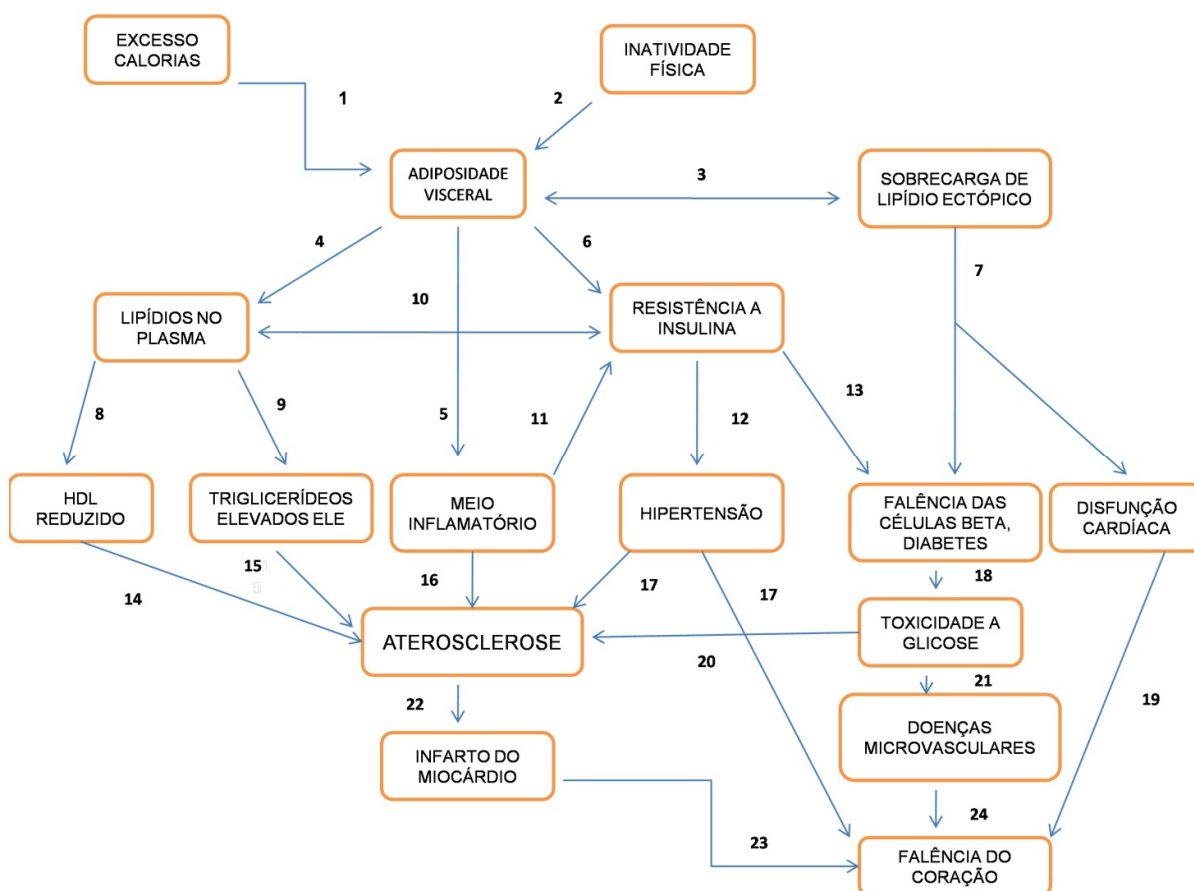


FIGURA 2 – INTERAÇÕES ENTRE OS FATORES DE RISCO PARA A SMET E AS DCVs E DMT2
FONTE: Adaptada de LUSIS, ATTIE e REUE (2008).

As múltiplas interações entre os componentes da síndrome metabólica apresentadas na Figura 2 podem ser, segundo LUSIS, ATTIE e REUE (2008), descritas da seguinte forma:

(1) a resposta ao excesso de calorías é influenciada por fatores genéticos, bem como outras interações (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; MARCINIAK; RON, 2006; VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006; SUBRAMANIAN *et al.*, 2008)

(2) os efeitos do exercício incluem aumento da lipoproteína lipase, redução plasmática de triglicerídeos, elevação do HDL, melhorando a tolerância a glicose,

funcionamento do coração e baixando a pressão sanguínea (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

(3) excesso de lipídio é estocado em gordura, porém o excesso de calorias pode promover também estocagem pelos tecidos ectópicos, tais como músculos e células beta pancreáticas, levando a uma forma de toxicidade (ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008; WANG *et al.*, 2008).

(4) excesso de gordura influencia os níveis de lipoproteínas: em obesos o aumento do fluxo de ácidos graxos livres pode estimular a produção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

(5) excesso de gordura resulta em um estado pró-inflamatório, devido à produção alterada de fatores inflamatórios (leptina), e fatores anti-inflamatórios (adiponectina), mediadores do recrutamento de macrófagos para o tecido adiposo (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; WAJCHENBERG *et al.*, 2002; GESTA; TSENG; KAHN, 2007; KRESSEL *et al.*, 2008).

(6) adiposidade excessiva contribui para a resistência à insulina, em parte devido ao aumento do nível de ácidos graxos livres e citocinas, e à diminuição da produção de adiponectina, que é sensibilizadora deste hormônio (WAJCHENBERG *et al.*, 2002; STRATFORD *et al.*, 2004; GESTA; TSENG; KAHN, 2007; CHIBALIN *et al.*, 2008; DORIA; PATTI; KAHN, 2008).

(7) sobrecarga da gordura ectópica pode desencadear disfunção da musculatura cardíaca, e também das células beta pancreáticas (ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008; PARK *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008).

(8) a obesidade pode levar ao declínio da hidrólise de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, mediado pela diminuição da lipoproteína lipase, e aumento do catabolismo de HDL-C, mediado pelo aumento da lipase hepática (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006)

(9) a obesidade causa a superprodução de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) pelo fígado, a resistência insulínica resulta também em uma inabilidade de suprimir a produção de glicose hepática (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

(10) uma característica comum da SMet é a super produção de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, mediada em partes pela resistência hepática a insulina, além

dos elevados níveis de ácidos graxos livres também contribuírem para este quadro (MUOIO; NEWGARD, 2008).

(11) interações envolvendo citocinas e mediadores inflamatórios produzidos pelo fígado, tecido adiposo, ou outros tecidos, podem contribuir para a resistência insulínica (MUOIO; NEWGARD, 2008).

(12) a obesidade e a resistência à insulina podem predizer o desenvolvimento de uma futura hipertensão. Este caminho pode ocorrer pela ativação do sistema nervoso simpático, bem como pelo sistema das angiotensinas-reninas. O receptor GPR91 pode explicar a ligação entre glicose elevada e renina (TOMA *et al.*, 2008).

(13) a resistência insulínica quase sempre precede a DMT2. No diabetes a habilidade das células beta em compensar a resistência à insulina, causada pelas mudanças metabólicas e massa corpórea, é perdida (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006; HUANG *et al.*, 2007; DORIA; PATTI; KAHN, 2008).

(14) níveis de HDL são inversamente proporcionais às doenças cardiovasculares. A função do HDL é transportar o colesterol dos tecidos periféricos para o fígado para transformar em bile, além de ter propriedades anti-inflamatórias (NAVAB; ANANTHARAMAIAH; FOGELMAN, 2005; VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

(15) níveis de triglicerídeos são fortes preceptores de DCVs, porém a base desta interação permanece desconhecida (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

(16) a obesidade pode exercer efeito direto e indireto em DCVs, os fatores pró-inflamatórios e pró-trombóticos são produzidos pela gordura visceral, e um número de adipocinas contribuem para o risco de DCV (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006).

(17) pressão sanguínea elevada tem efeitos adversos diretos nas artérias, arteríolas e no coração, e é fortemente associada ao infarto e hipertrofia do miocárdio (KING; ROTTER; MOTULSKY, 2002).

(18) o declínio da produção de insulina e o aumento da resistência a ela, resultam em elevados níveis de glicose, os quais podem ser tóxicos e pró-inflamatórios (HSUEH *et al.*, 2007; SORO-PAAVONEN *et al.*, 2008).

(19) a função cardíaca debilitada pode se combinar com outro fator da SMet, e culminar na falência do coração.

(20) níveis elevados de glicose podem contribuir para a aterosclerose (HSUEH *et al.*, 2007; SORO-PAAVONEN *et al.*, 2008).

(21) causas prováveis de disfunção endotelial incluem altos níveis de glicose, perfil lipídico alterado, e fatores pró-inflamatórios ligados a obesidade, tais como a interleucina 6, e possivelmente ao estresse oxidativo (VAN GAAL; MERTENS; DE BLOCK, 2006)

(22) o rompimento físico ou desnudamento endotelial acontece em aproximadamente 75% e 25%, respectivamente, dos casos de infarto do miocárdio (LIBBY; THEROUX, 2005).

(23) danos ao coração devido ao infarto do miocárdio promovem mudanças que levam a falência do coração.

(24) doenças microvasculares incluem danos às pequenas artérias, e podem afetar o funcionamento dos rins, cérebro e coração.

2.4 PRINCIPAIS DISTÚRBIOS ENDÓCRINOS QUE COMPÕEM A SÍNDROME METABÓLICA

2.4.1 Resistência Insulínica

A secreção da insulina é mediada por estímulos energéticos sensibilizadores das células β pancreáticas, entre os quais a glicose é a mais importante, sendo metabolizada no interior dessas células. A insulina por sua vez, atua de modo a estimular a captação da glicose nos tecidos alvo, dentre eles o músculo, fígado e tecido adiposo, e suspender a produção hepática da glicose (KNIGHTS *et al.*, 2014).

A sensibilização das células pela insulina ocorre via ligação aos seus receptores, presentes na maioria das células de mamíferos, e em grande número em adipócitos e hepatócitos (HARBER *et al.*, 2001).

A sensibilidade à insulina é chave para o funcionamento do corpo humano e desempenha papel crucial no desenvolvimento de patologias que têm se tornado muito comuns na sociedade moderna, e que influenciam tanto na duração, quanto na qualidade de vida dos indivíduos (RICCARDI; GIACCOB, 2004). A resistência insulínica é caracterizada pelo comprometimento da capacidade do músculo, fígado e tecido adiposo responder aos estímulos da insulina, o que resulta em níveis de glicose sanguínea elevados (KNIGHTS *et al.*, 2014), a progressão deste quadro está ligada a ineficiência na transdução de sinais através da ligação da insulina, e no comprometimento da cascata de reações desencadeada por essa sinalização (PETERSEN; SHULMAN, 2002).

A sensibilidade à insulina pode ser modulada por vários fatores ambientais, principalmente por hábitos alimentares. O conteúdo energético e a composição nutricional, principalmente os diferentes tipos de ácidos graxos, influenciam diretamente na sensibilidade à insulina (RICCARDI; GIACCOB, 2004). Modelos experimentais demonstram que a gordura saturada tem efeito negativo sobre a sensibilidade insulínica, enquanto que os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados ômega 6 tem efeito menos negativo sobre a insulina. Já os ácidos graxos ômega 3 melhoram a ação deste hormônio (STORLIEN *et al.*, 1991). Parillo *et al.* (1992) observaram que a diminuição na ingestão de gordura monoinsaturada, contrabalanceada pelo aumento da ingestão de carboidratos, agravou a insensibilidade à insulina, provavelmente pelo efeito da glicotoxicidade, já que os participantes eram diabéticos. O aumento da carga de glicose prejudicou seu controle glicêmico, afetando assim a sensibilidade insulínica. O *background* genético é responsável pela diversidade de respostas frente a estes fatores nutricionais, o que resulta em perfis mais ou menos suscetíveis a desenvolver a resistência insulínica, mesmo expostos a dietas semelhantes (FORD; GILES; DIETZ, 2002).

A obesidade, principalmente se associada com a adiposidade abdominal, também é um importante determinante para a modulação da sensibilidade à insulina (ASTRUP, 2001). Estudos sugerem que a perda de peso melhora a sensibilidade ao hormônio em tecidos periféricos, aumentando particularmente a capacidade do metabolismo não oxidativo da glicose (HENRY; WALLACE; OLEFSKY, 1986; ALBU; KONNARIDES; PI-SUNIYER, 1995).

A resistência insulínica nos músculos esqueléticos e cardíaco, independente dos fatores que a desencadearam, é devida a inibição do metabolismo da glicose através da ativação da via de oxidação de ácidos graxos (RANDLE; KERBEY; ESPINAL, 1988). A obesidade, principalmente a visceral, acarreta em níveis elevados de ácidos graxos crônicos na circulação. A elevação dos ácidos graxos livres (AGLs) circulantes é em grande parte devida ao aumento da gordura visceral, porque em comparação com a gordura subcutânea, apresenta maior atividade lipolítica e menor sensibilidade à supressão insulínica, além da sua posição anatômica conferir proximidade ao fígado, favorecendo a exposição da veia porta a liberação permanente de AGLs (KNIGHTS *et al.*, 2014).

O afluxo de grandes quantidades de ácidos graxos provenientes da dieta, ou da lipólise do tecido adiposo intra abdominal ao fígado, bloqueia o metabolismo da insulina neste órgão, desencadeia o aumento da neoglicogênese e o aumento da secreção de VLDLs (SUPLICY, 2000). Ocorre afluxo de AGLs também nos músculos esqueléticos, o que impacta negativamente na sinalização da insulina e possui especial importância, visto que a maior parte da glicose presente no sangue é metabolizada nos músculos. Estes eventos, efeitos da lipotoxicidade, levam a hiperinsulinemia compensatória, que pode culminar em hiperplasia e falência das células β pancreáticas, por meio do ciclo de Randle (RANDLE, 1994), levando a hiperglicemia crônica (NAWROCKI; SCHERER, 2004).

Os efeitos deletérios dos AGLs somam-se ainda ao desequilíbrio na secreção de adipocinas, devido ao aumento do tecido adiposo visceral, o que acarreta na superprodução de citocinas de efeito inflamatório e queda de produção das citocinas de efeito anti-inflamatório. Neste contexto, as adipocinas: leptina, adiponectina e adipolina desempenham funções de sensibilização à insulina (KNIGHTS *et al.*, 2014), sendo que a adiponectina e a adipolina apresentam correlação negativa entre as suas concentrações plasmáticas e a quantidade de tecido adiposo, enquanto que o desenvolvimento da resistência à leptina está presente em indivíduos obesos e com sobrepeso, ressaltando mais uma vez o papel do tecido adiposo visceral no estabelecimento e agravamento da resistência insulínica (KNIGHTS *et al.*, 2014).

2.4.2 Obesidade

2.4.2.1 Dados epidemiológicos da obesidade e parâmetros de mensuração

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), desde 1980, a obesidade mais que dobrou em todo o mundo. Em 2008, 1,5 bilhões de adultos e 20 bilhões de idosos estavam acima do peso ideal. Destes, mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres eram obesos. Quase 43 milhões de crianças estavam acima do peso em 2010. No mundo 65% da população vive em países onde o sobrepeso e a obesidade matam mais que a fome (Organização Mundial da Saúde, Health topics – Obesity).

Um estudo mais atual que contou com uma revisão sistematizada da prevalência da obesidade e sobrepeso no mundo todo, encontrou que no ano de 1980, 28,8% dos homens apresentava $IMC \geq 25$; em 2013 essa proporção chegou a 36,9%. Entre as mulheres essa proporção passou de 29,8% para 38,0% no mesmo intervalo de tempo. Entre as crianças e adolescentes de países desenvolvidos o sobrepeso e a obesidade em 2013 chegaram a 23,8% em meninos e 22,6% em meninas; e em países em desenvolvimento as estimativas elevaram-se de 8,1% para 12,9% entre meninos, e de 8,4% para 13,4% entre as meninas, em uma comparação de dados obtidos do ano de 1980 com os estimados no ano de 2013. No Brasil, o mesmo estudo encontrou que 52,5% dos homens, e 58,4% das mulheres com mais de 20 anos apresentavam sobrepeso ou obesidade em 2013, sendo que a média de obesidade entre os brasileiros superou a média global, mas ainda é inferior do que as estimativas obtidas em países como a Bolívia, Reino Unido, Estados Unidos e México (NG *et al.*, 2014).

A obesidade é uma doença que compromete aspectos sociais, psicossociais e biológicos, sendo uma das causas mais comuns da incapacidade funcional e redução da qualidade de vida, além de consistir em fator de risco para inúmeras doenças, algumas das quais já bem conhecidas, como as doenças cardiovasculares, dislipidemias, diabetes, doença hepática gordurosa não alcoólica; e outras, cuja conexão foi estabelecida a menos tempo, como alguns tipos de cânceres, doenças renais, psiquiátricas, asma e problemas de fertilidade (SKOLNIK; RYAN, 2014).

A principal causa do que vem sendo considerada uma epidemia de obesidade está no desequilíbrio entre a quantidade de energia ingerida e a quantidade de

energia usada. A disponibilidade de alimentos altamente enérgicos e muito palatáveis, aliada à tendência a inatividade física e ao sedentarismo promovem um estilo de vida altamente propenso ao desenvolvimento da obesidade (BRAY, 2004).

Dentre os parâmetros antropométricos, o IMC (índice de massa corpórea) é o mais utilizado para avaliar o estado nutricional em estudos populacionais e epidemiológicos. Ele é determinado pelo peso em Kg dividido pela altura (m) ao quadrado. Ao longo dos anos, os limites relativos ao sobrepeso e a obesidade vêm mudando. Atualmente, a OMS define o sobrepeso como $25 \leq \text{IMC} \leq 29,9 \text{ Kg/m}^2$; obesidade $30,0 \leq \text{IMC} \leq 39,9 \text{ Kg/m}^2$, e a obesidade mórbida $\text{IMC} \geq 40 \text{ Kg/m}^2$. No entanto, algumas limitações podem ser apontadas, como a ineficiência na determinação da composição corporal quanto a proporção de massa magra e gordura: indivíduos com IMC normal podem apresentar excesso de gordura, enquanto que indivíduos com IMC acima do considerado normal são assim classificados devido a quantidade de massa magra (GARN; LEONARD; HAWTHORNE, 1986). Outros parâmetros como a circunferência de cintura, relação cintura/estatura, e dobras cutâneas são importantes indicadores de aumento de risco para DCV e desordens metabólicas, fornecendo também informações mais precisas quanto à quantidade de gordura corporal (SÖNMEZ *et al.*, 2003).

2.4.2.2 Fatores não clássicos contribuintes para a obesidade: Composição nutricional

Alguns fatores, diferentes dos até então bem conhecidos, parecem estar contribuindo para o aumento da prevalência da obesidade. Entre estes fatores encontra-se a composição nutricional, uma vez que os efeitos metabólicos específicos dos nutrientes, como demonstrado por alguns estudos, parecem ser mais importantes que o conteúdo total de calorias ingeridas (STENVINKEL, 2014). Por exemplo, alimentos que estimulam a geração de ácido úrico (alimentos ricos em purinas, como carnes; e frutose, presente em frutas, geralmente com baixas calorias), podem estar mais associados à resistência insulínica, acumulação de gordura, e estresse mitocondrial, enquanto que os antioxidantes, pró-bióticos,

ômega 3, presentes em grãos, óleos vegetais e laticínios podem contrariar os efeitos de uma dieta rica em calorias através do impacto saudável que causam no metabolismo (JOHNSON *et al.*, 2009; LANASPA *et al.*, 2011; FLORES-MATEO *et al.*, 2013; STANHOPE; SCHWARZ; HAVEL, 2013). Em um estudo que avaliou 175 países, a composição nutricional já foi associada a variação na prevalência do diabetes, sendo que a variação analisada foi dissociada de fatores clássicos como a obesidade, sobrepeso e atividade física, e verificou-se que diferenças na disponibilidade de sacarose eram responsáveis pela variação (BASU *et al.*, 2013).

2.4.2.3 Microbiota Intestinal

A microbiota intestinal também parece exercer papel relevante na obesidade e síndrome metabólica, considerando que o valor nutricional dos alimentos é influenciado por ela e pelo microbioma (STENVINKEL, 2014), e que a flora intestinal é composta por aproximadamente 10^{14} bactérias, que, somadas, contém 150 vezes mais genes do que os hospedeiros humanos (QIN *et al.*, 2010). Interações desta relação mutualística vêm sendo sugeridas como subjacentes aos distúrbios metabólicos.

A indicação de que a flora intestinal poderia influenciar nas desordens metabólicas derivou de estudos animais, que verificaram diferenças em suas constituições ao comparar ratos obesos e não obesos (LEY *et al.*, 2005), e também ao analisar as mudanças ocorridas na flora intestinal de ratos condicionados a dietas ricas em gordura (TURNBAUGH *et al.*, 2008). Técnicas moleculares avançadas permitiram a identificação de quatro linhagens bacterianas predominantes: *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (Gram-negativas), e das Gram-positivas *Actinobacteria* e *Firmicutes*, e estudos tanto em modelos animais quanto em humanos apontam para uma redução da população de *Bacteroidetes* e proporcional aumento em *Firmicutes* em quadros de obesidade (LEY *et al.*, 2005; LEY *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que a flora intestinal pode aumentar a adiposidade a partir da otimização da extração de energia dos alimentos, e da modulação dos

processos envolvidos na estocagem de energia (BACKHED *et al.*, 2004; BACKHED *et al.*, 2007), inclusive regulando genes dos hospedeiros que regulam estes processos metabólicos (TILG; KASER, 2011).

Os mecanismos que modulam a diversidade da microbiota intestinal incluem fatores genéticos e ambientais, sendo que a dieta parece ser bastante influente neste sentido (HILDEBRANDT *et al.*, 2009; DE FILIPPO *et al.*, 2010). O fundo genético da diversidade microbiana pode determinar como os fatores dietéticos são manipulados, afetando diretamente a adiposidade do hospedeiro, como demonstrado em experimentos de transplante fecal (SONNENBURG *et al.*, 2010). Considerando este novo cenário, potenciais terapias que visam a manipulação da microbiota para contribuir na redução da obesidade vêm sendo estudadas, e constituem principalmente na inserção ou retirada de elementos da dieta, ou ainda administração de substâncias que podem favorecer determinadas linhagens bacterianas que sabidamente mantêm a homeostase energética (PAREKH *et al.*, 2014).

2.4.2.4 Disruptores endócrinos

Em 2010 a OMS declarou alta a prioridade de pesquisas na área dos desreguladores ou disruptores Endócrinos (*GLOBAL ASSESSMENT OF THE STATE-OF-THE-SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTORS*, 2010) que são definidos, segundo o *International Programme for Chemical Safety* (IPCS), como: “substância ou mistura exógena que altera a função do sistema endócrino e consequentemente causa efeitos adversos na saúde humana, em um organismo intacto, na sua descendência, ou em (sub) populações” (*GLOBAL ASSESSMENT OF THE STATE-OF-THE-SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTORS*, 2010).

Os disruptores podem mimetizar a ação dos hormônios naturais, interferindo na sua produção, ação e eliminação (COLBORN; VOM SAAL; SOTO, 1993). Incluem uma classe variada de moléculas tais como hormônios naturais ou sintéticos, pesticidas, produtos industriais, poluentes, componentes de plásticos e metais pesados, dentre outros (ALONSO-MAGDALENA; QUESADA; NADAL, 2011).

Derivam de fontes sintéticas, naturais, humanas, animais ou até mesmo de plantas, como é o caso dos fitoestrogênios, encontrados em certos grãos, verduras, e no alho, que podem imitar a ação do estrogênio e acarretar em benefícios a mulheres pós-menopausa (MARINI *et al.*, 2008; MARINI *et al.*, 2010). De modo geral, atuam via receptores nucleares; receptores de hormônios esteroides não nucleares; receptores não esteroides tais como: receptores de serotonina, dopamina e noradrenalina; vias enzimáticas envolvidas no metabolismo e/ou síntese de esteroides; e vários outros mecanismos que convergem na perturbação da homeostase endócrina e/ou reprodutiva (DE COSTER; LAREBEKE, 2012). A (TABELA 2) sintetiza algumas destas substâncias já conhecidas, bem como seu possível impacto na saúde humana.

TABELA 2 – DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Classe	Efeito	Substâncias	Onde são (eram) encontrados
Xenoestrogênios	Propriedades estrogênicas, diferindo muito em potência.	Naturais: fitoestrogênios	Soja, ervilha, feijão, linhaça, grão integrais
		Flavonóides	Hortaliças, frutas, chás, vinho, café, cacau
		Terpenóides	Óleos essenciais de plantas
		Micotoxina zearalenona	Produzida por fungos do gênero <i>Fusarium</i> que colonizam cereais, bananas e tomates
		Sintéticos: PCB	Lubrificantes, tintas, adesivos, óleos dielétricos em transformadores, fluido de troca térmica
		PBDE	Inibidores ou retardadores de chama adicionados em materiais de construção, têxteis, eletrônicos
		Ftalatos	Amaciadores de plásticos adicionados em utensílios médicos, domésticos, infantis, e em embalagens
		Alquilfenóis	Detergentes, praguicidas
		Bisfenol A	Utilizado na fabricação do policarbonato, presente na maioria dos plásticos de uso doméstico, filtros UV
		Exaustão de partículas de diesel	Atmosfera
Xenoandrogênios	Propriedades androgênicas	Sintéticos: Mistura comercial de PCB	Comercializadas sob nome de Ascarel - plastificantes pra tinta, fluidos, lubrificantes
		Benzofenona-2	Filtros solares
		Homosalato	Filtros solares

continua

TABELA 2 – DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Continuação e conclusão			
Classe	Efeito	Substâncias	Onde são (eram) encontrados
Antiestrogênicos	Inibidor dos estrógenos	Naturais: 20S-Protopanaxadiol	No ginseng
		Ginesteína	Grãos de soja
		Sintéticos: Benzofenona-4	Filtros solares
		Benzotriazolo	Agente ant-corrosivo usado em detergentes de lava-louças
		Misturas complexas de poluentes	Encontradas no ambiente em geral
Antiandrogênicos	Inibidor dos andrógenos	Sintéticos: PCB138	Lubrificantes, tintas, adesivos, óleos dielétricos em transformadores, fluido de troca térmica
		Pesticidas organoclorados	Inseticidas, fungicidas e herbicidas
		DDT	Pesticidas
Perturbadores da função da tireóide	Desequilibram a homeostase energética e o crescimento	Sintéticos: Triclosan	Produtos antibacterianos
		Bisfenol A	Utilizado na fabricação do policarbonato, presente na maioria dos plásticos de uso doméstico, filtros UV
		Compostos perfluorados	Impermeabilizantes utilizados em tecidos, papéis e principalmente superfícies antiaderentes de painéis
Perturbadores da função do corticóide	Desequilibram a atuação hormonal dos corticóides	Hexaclorobenzeno	Fungicida, corantes, borracha sintética

FONTE: Adaptado de DE COSTER e LAREBEKE (2012).

NOTA: (1) PCB: bifenilo policlorados; (2) PBDE: Difetil éteres polibromados; (3) DDT: Dicloro-difenil-tricloroetano

Essas substâncias possuem efeito cumulativo, e algumas são extremamente resistentes à degradação metabólica, sendo estocadas no tecido adiposo pela sua natureza lipofílica, permanecendo também no ambiente por longos períodos de tempo (ALONSO-MAGDALENA; QUESADA; NADAL, 2011). Enquanto a relevância dos disruptores endócrinos no desenvolvimento de cânceres, infertilidade, diabetes, obesidade e síndrome metabólica cresce a medida que as pesquisas avançam, os órgãos de saúde pública recomendam a identificação de novas substâncias, e a educação da população quanto a exposição a estes fatores, a fim de se obter um

panorama mais específico dos mecanismos de ação destes componentes, e de se evitar maiores prejuízos à saúde das pessoas (DIAMANTI-KANDARAKIS *et al.*, 2009).

2.4.3 Relevância metabólica do tecido adiposo

Por muito tempo foi propagado que o tecido adiposo consistia de um passivo reservatório energético e isolante térmico, no entanto, a partir da identificação deste tecido como principal sítio do metabolismo dos hormônios sexuais, em 1987, e da caracterização de substâncias metabolicamente ativas secretadas por ele, dentre estas a leptina em 1994, esta concepção original foi totalmente alterada (FRAYN *et al.*, 2003; KERSHAW; FLIER, 2004).

O papel fisiológico e a importância do tecido adiposo em contextos de desequilíbrio metabólico foram imensamente ampliados, permitindo sua classificação como um órgão endócrino, secretor de substâncias chamadas adipocinas que atuam tanto em nível local (autócrino/parácrino) quanto a nível sistêmico (endócrino) (KERSHAW; FLIER, 2004). Além dos adipócitos, este tecido contém várias outras células, tais como: pré-adipócitos; fibroblastos; macrófagos; células endoteliais e células musculares lisas. Esta diversidade celular também contribui para a variedade de fatores secretados, e, por conseguinte, para a modulação de vias metabólicas sistêmicas (GIMENO; KLAMAN, 2005). Estão presentes neste tecido uma variedade de receptores responsáveis por interpretar e ativar vias de estocagem e de liberação de energia, além de uma gama de receptores capazes de responder a estímulos dos sistemas hormonais clássicos, e do sistema nervoso central, sendo capaz então de responder a sinais distantes, fazendo parte de uma complexa rede interligada que regula as funções metabólicas, dentre estas, o metabolismo energético, imunológico e neuroendócrino (KERSHAW; FLIER 2004).

Neste contexto funcional, os diferentes depósitos de gordura exercem papéis distintos, isso é demonstrado pelo risco aumentado para o desenvolvimento de DMT2 e de DCV que configura a presença de gordura abdominal (distribuição de

gordura androide), enquanto que a gordura gluteofemoral (distribuição de gordura ginóide) é associada com melhores perfis metabólicos e cardiovasculares (SNIJDER *et al.*, 2004; YUSUF *et al.*, 2005). Neste contexto, o fator que melhor prediz tais patologias é a quantidade específica de gordura visceral, localizada acima do fígado (MONTAGUE; O'RAHILLY, 2000). A base molecular para o acúmulo desproporcional de gordura nesta região não é totalmente compreendida, assim como não é bem estabelecido se a gordura visceral seria causa ou efeito da síndrome metabólica (MONTAGUE; O'RAHILLY, 2000). Porém, sabe-se que os hormônios esteroides desempenham papel determinante no dimorfismo sexual presente na distribuição de gordura, inclusive a visceral, já que o aumento dela foi correlacionado com a ausência do efeito protetor do estrógeno em mulheres pós-menopausa (GEER; SHEN, 2009).

A exposição a níveis excessivos de glicocorticoides parece contribuir também para o acúmulo de gordura nesta região (MASUZAKI *et al.*, 2001), uma vez que estes hormônios regulam a diferenciação do tecido adiposo, a sua função, e também a sua distribuição. A ação dos glicocorticoides está condicionada tanto aos seus níveis plasmáticos, quanto a densidade de pré-receptores celulares ligados ao seu metabolismo (SECKL; WALKER, 2001).

A relevância deste depósito de gordura, em específico para as desordens metabólicas, reside no fato de que ele apresenta a lipogênese e lipólise aumentadas, sendo portanto, metabolicamente mais ativo em relação aos depósitos subcutâneos. A lipólise libera AGLs, os quais entram diretamente no fígado via veia porta, levando ao aumento da síntese de lipídeos, gluconeogênese e resistência insulínica, o que pode resultar em dislipidemias, intolerância a glicose e hipertensão (MATSUZAWA *et al.*, 1995). Além disso, existem diferenças quanto ao tipo e quantidade de adipocinas secretadas pelo depósito de gordura visceral e subcutâneo. O depósito visceral é responsável pela maior secreção de adipocinas pró-inflamatórias como a resistina, angiotensina I, e interleucina 6, seguido do tecido adiposo subcutâneo abdominal, e do tecido adiposo subcutâneo gluteofemoral (WAJCHENBERG, 2000; GIACCHETTI *et al.*, 2002; MCTERNAN *et al.*, 2002).

Sendo assim, frente a todas estas substâncias secretadas pelo tecido adiposo, e frente aos estímulos endócrinos que ele é capaz de responder, seu papel tornou-se central para o entendimento dos distúrbios metabólicos, assim como

medidas de prevenção e tratamento voltaram-se para a conservação do seu equilíbrio como forma de manutenção da homeostase.

2.4.3.1 Metabolismo de Lipídeos

O colesterol e os triglicerídeos são lipídeos de importância clínica presentes no sangue, cujas funções incluem estruturar membranas celulares, compor os hormônios esteroides, e formar ácidos biliares, no caso do colesterol; enquanto que os triglicerídeos armazenam energia no tecido adiposo e a fornece aos músculos (HAVEL; KANE, 2001).

Pela sua natureza lipofílica e hidrofóbica essas moléculas não se dissolvem por si só no plasma, havendo a necessidade de incorporação de outras moléculas para que se tornem miscíveis ao sangue. Essas moléculas são as apolipoproteínas, componentes proteicos das lipoproteínas, que são formadas então pelo componente lipídico e proteico. Basicamente, as apolipoproteínas atuam estruturando a molécula de lipoproteína, servindo de ligante a receptores específicos, e co-regulando o metabolismo dessas moléculas (HAVEL; KANE, 2001).

As lipoproteínas são classificadas com base no seu tamanho e fluidez (HAVEL; KANE, 2001) e as principais características das lipoproteínas de interesse clínico estão apresentadas na (TABELA 3).

TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS DAS LIPOPROTEÍNAS DE INTERESSE CLÍNICO

Nome	Densidade (g/mL) e diâmetro (nm)	Origem	Componente protéico principal	Componente lipídico principal
Quilomícron	<0,95 e 100 - 1000	Intestino	Apolipoproteína B-48	Triglicerídeos
VLDL ⁽¹⁾	0,95-1,006 e 30-80	Fígado	Apolipoproteína B-100	Triglicerídeos
IDL ⁽²⁾	1,006-1,019 e 25-50	Hidrólise das VLDLs	Apolipoproteína B-100	Triglicerídeos e Colesteril-éster
LDL ⁽³⁾	1,019-1,063 e 18-28	Hidrólise das VLDLs	Apolipoproteína B-100	Colesteril-éster
HDL ⁽⁴⁾	<1,063 e 7-17	Fígado e intestino	Apolipoproteína A-1	Colesteril-éster

FONTE: Adaptado de HAVEL; KANE (2001).

NOTA: (1) Lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL); (2) Lipoproteína de densidade intermediária (IDL); (3) Lipoproteína de baixa densidade (LDL); (4) Lipoproteína de alta densidade (HDL).

Os lipídeos são metabolizados pelas vias exógena e endógena, dependendo da origem das moléculas de gordura a serem transportadas: dietética ou hepática, respectivamente, sendo que as lipoproteínas possuem papel ativo extremamente importante em ambas.

A via exógena tem início com a absorção intestinal dos ácidos-graxos e colesterol que são esterificados em triglicerídeos e colesteril-éster e incorporados aos quilomícrons, que deixam as células intestinais e são lançados ao plasma. Os quilomícrons são então hidrolisados pela lipoproteína lipase (LPL) presente no endotélio capilar, através do reconhecimento da apolipoproteína C-II presente na superfície dos quilomícrons. Os triglicerídeos hidrolisados dão origem a ácidos graxos livres que serão incorporados ao tecido adiposo (reserva energética) e/ou consumidos pelos músculos. Durante o processo de perda dos triglicerídeos o quilomícron diminui de tamanho e alguns de seus componentes são realocados em moléculas de HDL. As partículas remanescentes dos quilomícrons são captadas pelo fígado, através do reconhecimento da apolipoproteína E, e lá são degradadas liberando o colesterol oriundo da dieta (HAVEL; KANE, 2001).

A via endógena inicia-se pela secreção das lipoproteínas VLDL ricas em triglicerídeos pelo fígado. No plasma ela adquire a apolipoproteína C-II da molécula de HDL, que será da mesma forma reconhecida pela LPL no endotélio da maioria

dos capilares sanguíneos, fornecendo ácidos graxos ao tecido adiposo e aos músculos (BRUNZELL; FAILOR, 2010).

Aproximadamente metade das remanescentes de VLDL (as IDLs- produto da hidrólise das VLDLs) são degradadas pelo fígado, através do reconhecimento das moléculas de apolipoproteína E, enquanto que a outra metade é hidrolisada pela lipase hepática (LH), dando origem as moléculas de LDL (contendo apolipoproteína B-100 e alto teor de colesterol-éster). A LDL circula pelo plasma, sendo absorvida pelo fígado e células periféricas via ligação do seu receptor (LDLR) às moléculas de apo B-100 presentes na sua superfície, sendo então hidrolisadas, liberando principalmente o colesterol (BRUNZELL; FAILOR, 2010).

O excedente de colesterol dos tecidos extra-hepáticos é removido pelo HDL, que faz, portanto, o transporte reverso deste lipídeo. Após alguns processamentos, esta molécula de HDL torna-se maior e adquire a apo A-II, que será reconhecida no fígado, desencadeando a sua hidrólise, gerando partículas menores e mais densas, chamadas de HDL₃, e subsequentemente, partículas ainda menores. O colesterol liberado da HDL nos hepatócitos pode ser transformado, ou não, em sais biliares, e excretado pelas vias biliares (BRUNZELL; FAILOR, 2010).

A (FIGURA 3) sintetiza as vias exógena e endógena do metabolismo de lipídeos.

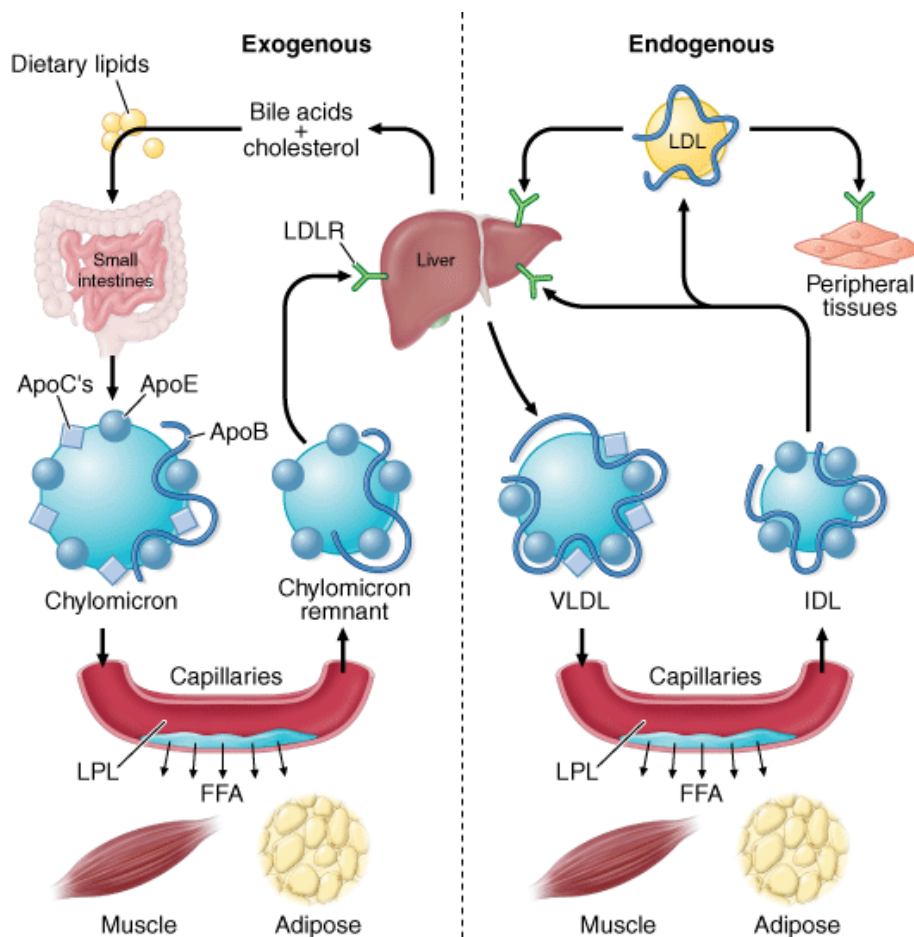


FIGURA 3 – METABOLISMO ENDÓGENO E EXÓGENO DE LIPÍDEOS

FONTE: FAUCI *et al.*, 2008 (versão editada retirada de <http://www.acesmedicine.com>)

2.4.3.2 Dislipidemias

O termo dislipidemia corresponde a uma gama de distúrbios caracterizados por níveis anormais (altos e/ou baixos) das lipoproteínas, além das anormalidades na composição dessas partículas (BRUNZELL; FAILOR, 2010).

As dislipidemias possuem importância clínica devido a sua contribuição em processos aterogênicos, pancreatite, e doença do fígado esteatótico, além de serem consideradas fatores de risco para a síndrome metabólica (BRUNZELL; FAILOR, 2010).

A Tabela 4 sintetiza a classificação fenotípica das dislipidemias primárias, sendo que genotipicamente podem ser monogênicas, ou ainda, mais

frequentemente, possuir etiologia complexa, com envolvimento de múltiplas variantes genéticas e ambientais. Já as dislipidemias secundárias acontecem em decorrência do metabolismo de fármacos, ou doenças como o diabetes, por exemplo.

TABELA 4 - CLASSIFICAÇÃO DAS DISLIPIDEMIAS

Classificação	Tipo de lipoproteína alterada
Hipercolesterolemia isolada	LDL-C \geq 160 mg/dl
Hipertrigliceridemia isolada	TG \geq 150 mg/dl
Hiperlipidemia mista	LDL-C \geq 160 mg/dL e TG \geq 150 mg/dL
HDL-C baixo	< 40mg/dl em homens e < 50mg/dL em mulheres

FONTE: Adaptada da V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATHEROSCLEROSE, 2013.

O desequilíbrio dos eventos que compõem o metabolismo lipídico são os responsáveis pelo desenvolvimento das dislipidemias, dentre estes eventos, quatro passos são especialmente importantes: Montagem das VLDLs, hidrólise pela LPL, catabolismo dos remanescentes, e o catabolismo da LDL (BRUNZELL; FAILOR, 2010). Anormalidades na secreção de VLDL podem ocorrer na hipertrigliceridemia familiar (HTGF) (OMIM 145750) (associada a mutações nos genes *APOA5* e *LIP1*); e na hiperlipidemia combinada familiar (HLCF) (OMIM 602491) (associada a mutações no gene *USF1*). Na primeira forma existe um número excessivo de triglicerídeos contidos em um número normal de VLDL, e a segunda forma caracteriza-se por presença excessiva de apolipoproteína B-100 nas moléculas de VLDL ou LDL, tornando-as menores que o normal (BRUNZELL, 2007; KANE; HAVEL (Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins)). O comprometimento de produção ou de função da LPL acarreta em hiperlipidemias raras, geralmente de causa autossômica recessiva. No entanto, podem ter causa adquirida também, devido a complicações de diabetes ou uremia (BRUNZELL; DEEB, 2001). Quando o problema encontra-se na fase de catabolismo dos remanescentes, algumas variantes alélicas do gene *APOE*, que codificam produtos com pouca afinidade aos receptores dos hepatócitos, estão envolvidas, acarretando

em aumento dos remanescentes de quilomícron e VLDL, verificados através da hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (MAHLEY; RALL, 2001). O catabolismo da LDL pode representar a última etapa em que problemas no metabolismo lipoprotéico podem surgir. Problemas na produção ou afinidade do receptor de LDL (LDLR), ou ainda problemas na produção da apolipoproteína B-100, que é seu ligante, podem causar acúmulo de LDL plasmático, já que ele não consegue ser catabolizado. Os fatores dietéticos, tais como a quantidade de colesterol, podem interferir na remoção do LDL plasmático através da inibição dos receptores hepáticos (GOLDSTEIN; HOBBS; BROWN, 2001).

Além da influência genética, alguns fatores endócrinos e dietéticos interferem no metabolismo das lipoproteínas. A insulina e a disponibilidade de substratos desempenham papel fundamental na regulação da taxa de secreção das VLDLs, influenciando a regulação dos níveis de triglicerídeos hepáticos e a síntese de colesterol, além da formação e maturação das lipoproteínas secretadas por ele (HORTON; GOLDSTEIN; BROWN, 2002; WOLFRUM *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2005). A disponibilidade de ácidos graxos monoinsaturados e ácidos oléicos pode estimular esta formação de VLDL, sendo assim, dietas ricas em carboidratos e gorduras tem um profundo efeito nos níveis de circulantes de triglicerídeos e na secreção de VLDL (VERSCHOOR *et al.*, 1985; HOLLENBECK, 1993; TAGHIBIGLOU *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2005).

Existe muita preocupação quanto à vigilância e o tratamento das dislipidemias no mundo todo, visto que baixos níveis de HDL-C e níveis elevados de LDL-C são considerados fatores de risco modificáveis para doenças cardiovasculares em homens e mulheres (KANNEL; CASTELLI; GORDON, 1979; KEYS *et al.*, 1984).

2.5 DOENÇAS RELACIONADAS A SÍNDROME METABÓLICA: *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

O *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2) é uma desordem metabólica que compromete a homeostase, caracterizada por hiperglicemia e metabolismo lipídico alterado, causado pela deficiência das células β pancreáticas em secretar níveis

adequados de insulina, devido a variação dos graus de super-nutrição, inatividade física, consequente sobrepeso ou obesidade, e resistência à insulina (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Os efeitos desta doença são enormes, devido ao aumento global da sua prevalência e ao dano que pode causar a vários órgãos do corpo, além dos custos diretos e indiretos para a saúde pública (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

A prevalência do diabetes em todo o mundo entre os adultos foi de 285 milhões (6,4%) em 2010, e este valor deve subir para aproximadamente 439 milhões (7,7%) em 2030 (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). A DMT2 é a forma predominante, e está presente em 90% dos casos (GONZALEZ *et al.*, 2009), o aumento na sua prevalência está previsto para ser muito maior nos países em desenvolvimento que nos países já desenvolvidos (69% x 20%) (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010).

A população brasileira apresentou crescimento histórico na prevalência do diabetes: 4,1% em 1987 (Censo Nacional de Diabetes); 5,5% em 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e, de acordo com os dados da VIGITEL (Vigilância dos Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), 6,9% em 2013 (VIGITEL BRASIL, 2013). Os autores salientam que é preciso considerar que tal estimativa detecta apenas doenças já conhecidas, portanto tal índice pode ter sido subestimado, considerando que nem todos os portadores da doença possuem diagnóstico (VIGITEL BRASIL, 2013).

Em países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, as pessoas com idade entre 40 e 60 anos, ou seja, em idade ativa, são as mais afetadas quando comparadas com aquelas com mais de 60 anos em países desenvolvidos (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010). O aumento na incidência do DMT2 é extremamente correlacionado às mudanças no estilo de vida ocidental, que ganhou influxo muito grande de alimentos altamente energéticos industrializados, que combinados ao estilo de vida sedentário em países em desenvolvimento foram determinantes para o aumento de sua incidência (CHAN *et al.*, 2009; COLAGIURI, 2010).

Interações complexas entre traços presentes na SMet e fatores ambientais, inclusive aqueles presentes no início do desenvolvimento embrionário, além dos atuantes em estágios posteriores da vida do indivíduo, levam a um excesso crônico

de nutrientes, o qual impulsiona o desenvolvimento de DM2, como mostra a (FIGURA 4).

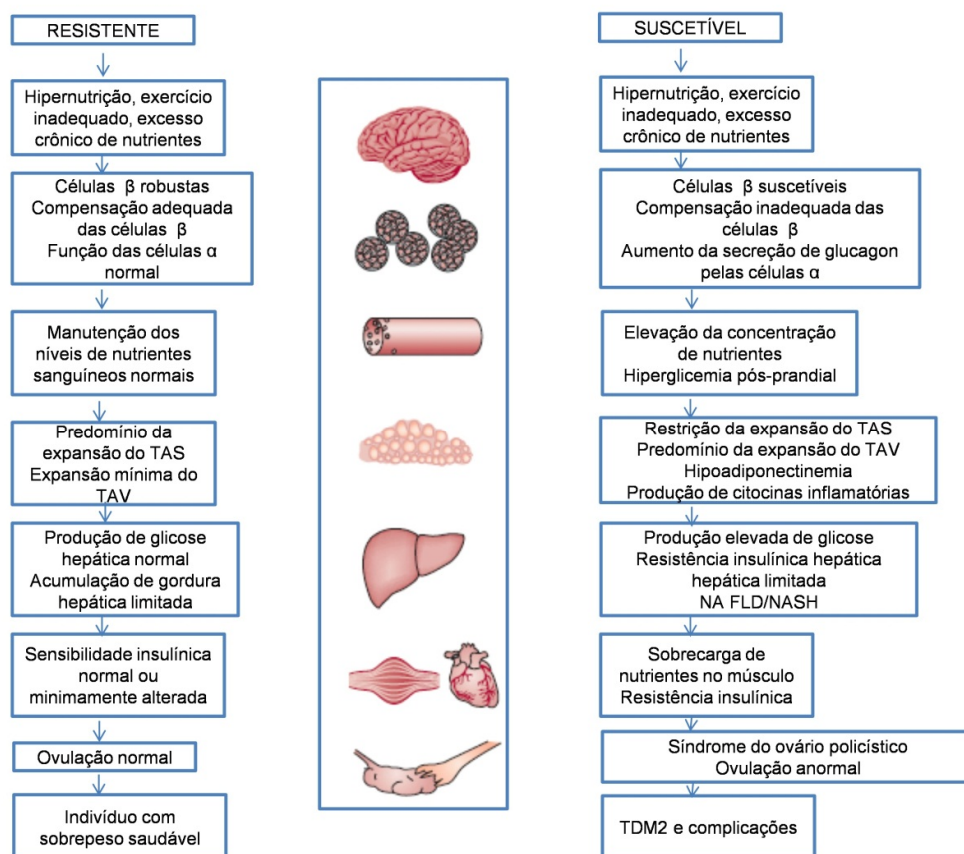


FIGURA 4 – DESENVOLVIMENTO DE DM2 E COMPLICAÇÕES RELACIONADAS

FONTE: NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011

NOTA: TAS= tecido adiposo subcutâneo; TAV= tecido adiposo visceral; NA FLD= doença do fígado gorduroso não alcoólico; NASH= hepatite não alcoólica

Indivíduos super-nutridos e sedentários, resistentes ao diabetes, são capazes de conter a sobrecarga energética devido a células β mais resistentes, que garantem a secreção compensatória de insulina, além da inalteração das células α (secretoras de glucagon), mantendo dessa forma o nível sanguíneo de nutrientes adequado. Há predomínio da expansão do tecido adiposo subcutâneo em detrimento ao crescimento do tecido adiposo visceral; a produção de glicose hepática se mantém normal, bem como a acumulação de triglicerídeos no fígado, o que mantém a sensibilidade insulínica inalterada ou minimamente desequilibrada. Estes eventos culminam em um indivíduo com sobrepeso, porém saudável (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Em indivíduos suscetíveis ao diabetes, a sobrecarga crônica de nutrientes não é contida devido à falência das células β quando sobrecarregadas, e aumento da secreção de glucagon, desta forma, os níveis de glicemia se elevam no sangue. O crescimento do tecido adiposo visceral é preponderante com relação ao tecido adiposo subcutâneo, o que acarreta em secreção aumentada de adipocitocinas inflamatórias, e queda na secreção de fatores protetores (hipoadiponectinemia). Ocorre aumento na produção de glicose hepática e insulino resistência neste órgão, a resistência insulínica se estende aos músculos esqueléticos e o DMT2 se estabelece, além de complicações associadas (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Embora a maioria dos defeitos metabólicos esteja presente em algum grau nos pacientes com DMT2, tal patologia é altamente heterogênea. A suscetibilidade diferencial ligada a muitos genes diferentes tem sido identificada. Tais genes interagem com fatores fisiológicos durante a infância e a vida adulta, com fatores nutricionais e com atividade física ao longo da vida do indivíduo (OSTBYE *et al.*, 1989; O'DEA, 1991; DABELEA *et al.*, 2000; PRENTKI; NOLAN, 2006; CHAN *et al.*, 2009; VOIGHT *et al.*, 2010; HERDER; RODEN, 2011; HOCHBERG *et al.*, 2011).

A herdabilidade para a DMT2 é alta (estimada em mais de 50%), como indicam altas taxas de concordância em estudos com gêmeos monozigóticos e o notável aumento do risco em indivíduos com parentes em primeiro grau afetados (TATTERSALL; FAJANS, 1975; PIERCE; KEEN; BRADLEY, 1995; MEDICI *et al.*,

1999; DIABETES GENETICS INITIATIVE OF BROAD INSTITUTE OF HARVARD *et al.*, 2007; SLADECK *et al.*, 2007; POULSEN *et al.*, 2009; HEMMINKI *et al.*, 2010; HERDER; RODEN, 2011).

Um estudo com suecos sobre o risco familiar para DMT2 mostrou que o risco relativo é aumentado em indivíduos com pelo menos dois irmãos afetados, independente da ocorrência de DMT2 nos pais (HEMMINKI *et al.*, 2010). Tal achado sugere que o compartilhamento de um mesmo ambiente intrauterino, pós-natal, e ainda, condições nutricionais semelhantes durante a infância, e provavelmente durante a adolescência, são combinações importantes que podem determinar um risco elevado para o desenvolvimento de *diabetes mellitus* do tipo 2 (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

Estudos de associação genômica têm estabelecido um número cada vez maior de *loci* associados ao diabetes (mais de 40) (ZEGGINI *et al.*, 2008; DUPUIS *et al.*, 2010; SAXENA *et al.*, 2010; VOIGHT *et al.*, 2010; HERDER; RODEN, 2011).

A maioria destes *loci* é associada com a função das células β . Grande parte dos pacientes que apresentam formas monogênicas de diabetes também tem defeitos gênicos que afetam a função das células β (MURPHY; ELLARD; HATTERSLEY, 2008; O'RAHILLY, 2009). No entanto, somente aproximadamente 10% da herdabilidade do DMT2 pode ser explicada pela suscetibilidade determinada por *loci* identificados até o momento, com cada *locus* tendo um pequeno efeito sobre o fenótipo (HERDER; RODEN, 2011). A herdabilidade restante pode estar relacionada a um grande número de variantes menos comuns (alelos com frequência inferior a 5%) que são dificilmente amostrados em abordagens de varredura do genoma (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011).

2.5.1 Doenças cardiovasculares

Como explicado no tópico 2.1 (HISTÓRICO E DEFINIÇÃO DA SINDROME METABÓLICA), a pressão arterial elevada é associada em maior grau do que

seria de se esperar ao acaso com a resistência insulínica, obesidade abdominal, e dislipidemias, traços principais da síndrome metabólica. Outros fatores podem co-existir com a SMet, sendo eles: hiperuricemia; aumento da apolipoproteína B e das moléculas pequenas e densas de LDL-C; fatores pró-trombóticos; inflamação crônica de baixo grau; doença hepática gordurosa não alcoólica; esteato-hepatite não alcoólica; apneia obstrutiva do sono e síndrome do ovário policístico, todos estes fatores aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MULÈ *et al.*, 2014). A (FIGURA 5) esquematiza possíveis mecanismos pró-hipertensivos presentes na síndrome metabólica.

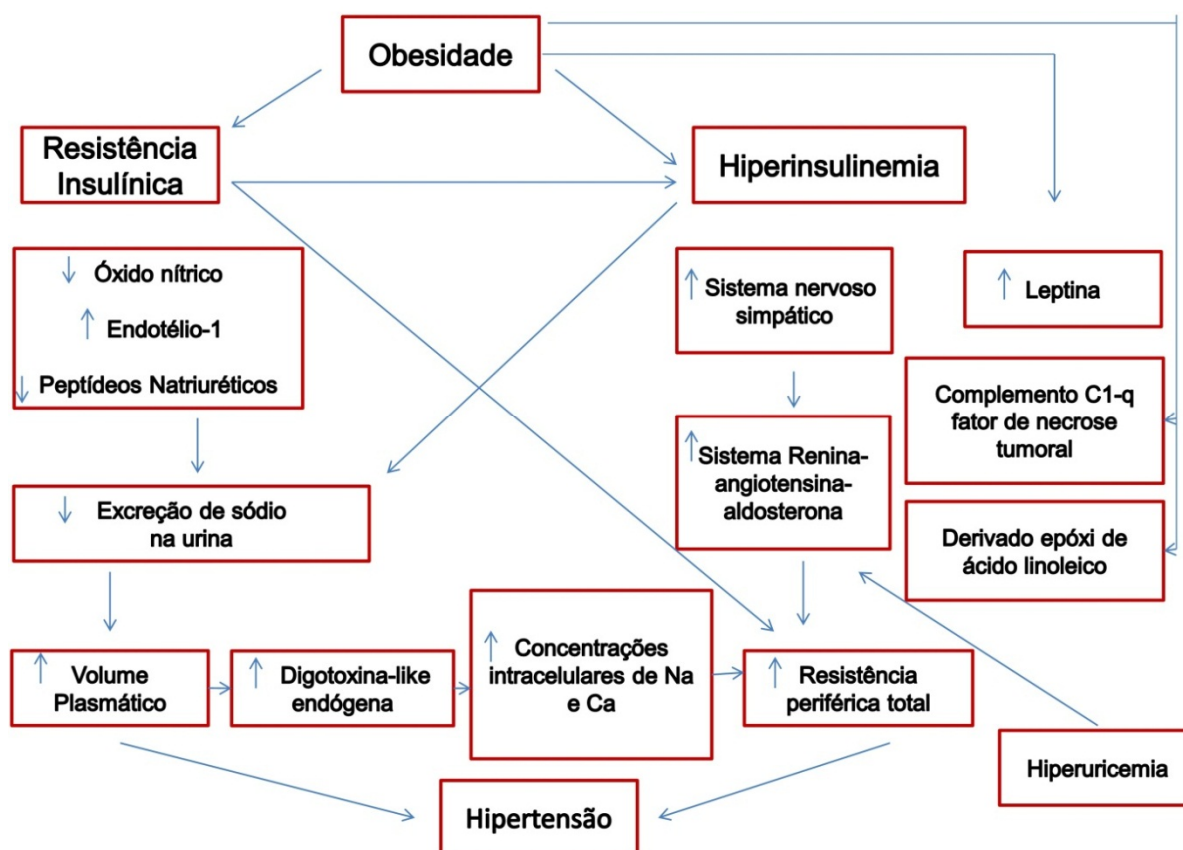


FIGURA 5 – MECANISMOS PRÓ-HIPERTENSIVOS SUBJACENTES A SMET
FONTE: Adaptado de Mulè *et al.* (2014)

Valores elevados de pressão sanguínea e hipertensão são frequentes em pacientes com SMet - 80%, como demonstrado no estudo de Mancía e colaboradores (MANCÍA *et al.*, 2007), assim como a SMet é mais frequente em indivíduos hipertensos, comparados a população geral (SCHILLACI *et al.*, 2004; PANNIER *et al.*, 2008; CHAUDHARY *et al.*, 2011). A prevalência da SMet em uma população da França foi de 5,4% entre homens e 2,8% entre mulheres, ambos não hipertensos, chegando a 19,3% entre os homens hipertensos e a 14,8% entre as mulheres hipertensas (MULÉ *et al.*, 2014).

Doenças cardiovasculares constituem um grupo de desordens do coração e dos vasos sanguíneos que incluem: doenças coronárias do coração (desordens nos vasos que suprem o coração); doenças cerebrovasculares (desordens nos vasos sanguíneos que suprem o cérebro); doenças arteriais periféricas (desordens nos vasos sanguíneos que suprem os braços e pernas); doenças do coração reumáticas (danos ao músculo e as valvas do coração a partir da febre reumática, causada pela bactéria *Streptococcus*); doenças do coração congênitas (malformações do coração); trombose e embolia pulmonar (coágulos formados nos vasos das pernas que podem se deslocar e se mover até o coração ou pulmões) (Organização Mundial da Saúde. Health topics – Cardiovascular Disease).

As estatísticas das DCV são alarmantes: são a causa número 1 de morte no mundo todo; aproximadamente 17,3 milhões de pessoas morreram de DCV em 2008, representando 30% do total de mortes global. Deste total, um estimado de 7,3 milhões de mortes foram devidas a doenças coronárias e 6,2 milhões foram devidas a ataques cardíacos (Organização Mundial da Saúde. Health topics – Cardiovascular Disease).

Países de baixa e média renda são desproporcionalmente afetados: mais de 80% das mortes por DCV ocorrem em países de baixa renda, e ocorrem quase igualmente em homens e mulheres (Organização Mundial da Saúde. Health topics – Cardiovascular Disease).

Em 2030 aproximadamente 23,6 milhões de pessoas deverão morrer de DCVs, principalmente de doenças do coração e ataques cardíacos (Organização Mundial da Saúde. Health topics – Cardiovascular Disease).

Os componentes da SMet associados a alguns fatores ambientais, tais como o uso do tabaco e a inatividade física, são fatores extremamente importantes para o desenvolvimento prematuro de doenças cardiovasculares e seus números alarmantes (THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2002).

2.6 SÍNDROME METABÓLICA E GENÉTICA

O aumento global da incidência da síndrome metabólica e diabetes do tipo 2 ao longo das últimas décadas é um excelente exemplo de como a interação entre estilo de vida e genótipo pode impactar na saúde (ROCHE; PHILLIPS; GIBNEY, 2005).

A natureza familiar (RICH, 1990; FREEMAN *et al.*, 2002; MILLS *et al.*, 2004), a marcante diferença na prevalência da doença entre grupos étnicos distintos (AL-SHAER; ABUSABHA, 2005), e as taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos (POULSEN *et al.*, 2009), são indícios de que a síndrome metabólica tenha base genética, onde tal componente estaria conferindo maior ou menor suscetibilidade à doença (ROCHE; PHILLIPS; GIBNEY, 2005).

A variação inter individual para o risco de síndrome metabólica é devida, provavelmente, à interação entre fatores ambientais e genéticos. Vários estudos epidemiológicos demonstram efeitos prejudiciais de ácidos graxos saturados na sensibilidade insulínica (STORLIEN *et al.*, 1996; MEYER *et al.*, 2001; VAN DAM *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2003), no entanto, estudos com intervenção confirmam que estes efeitos funcionais são mistos (BLOK *et al.*, 1997; MAYER-DAVIS *et al.*, 1997; LOVEJOY *et al.*, 2002; LUU *et al.*, 2007; HARTWEG *et al.*, 2008), possivelmente refletindo a heterogeneidade genética em interação com a dieta e

com atividade física (PHILLIPS *et al.*, 2006; SZABODE EDELENYI *et al.*, 2008; PHILLIPS *et al.*, 2010).

As estimativas de herdabilidade para a síndrome metabólica variam de 10% a 30% (BOSY-WESTPHAL *et al.*, 2007; HENNEMAN *et al.*, 2008; BELLIA *et al.*, 2009), indicando que tal patologia é parcialmente herdável. O conhecimento dos fatores genéticos que contribuem para o desenvolvimento da SMet pode ajudar a explicar por que os fatores que compõem esta síndrome co-ocorrem dentro de um mesmo indivíduo mais frequentemente do que seria esperado ao acaso (POVEL *et al.*, 2011).

A variabilidade genética possui especial importância nos fatores isolados da SMet, pois, variantes genéticas de suscetibilidade raras e comuns podem afetar um ou mais dos seus traços, e certas combinações destes componentes de desequilíbrio metabólico irão culminar no estabelecimento da síndrome. Sendo assim, estudar a influência genética sobre os fatores isolados da SMet pode facilitar a visualização de associações que talvez não seriam identificadas caso fosse avaliada a associação com a SMet, e não com os seus fatores decompostos.

2.6.1 Genes relacionados à síndrome metabólica contemplados neste estudo

2.6.1.1 Hidroxiesteróide (11- beta) desidrogenase 1 (*HSD11B1*)

A enzima 11 β hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1) trabalha mais frequentemente como uma redutase, convertendo a cortisona (forma inativa) em cortisol (forma ativa), mas também cataliza a reação reversa (cortisol para cortisona) em condições específicas, funcionando como uma desidrogenase. A outra isoforma 11 β hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2) cataliza

somente a reação de desidrogenação, desativando o cortisol (GATHERCOLE *et al.*, 2013) (FIGURA 6).

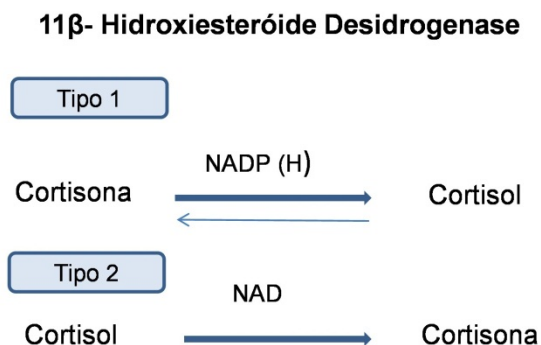


FIGURA 6 – REAÇÕES CATABOLIZADAS PELA 11 β -HIDROXIESTERÓIDE DESIDROGENASE
 FONTE: Adaptado de GATHERCOLE *et al.* (2013)

O cortisol é liberado em resposta ao estresse, sob o controle do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal. 90% do cortisol circulante está ligado a uma alta afinidade com a globulina, 6% ligado a uma baixa afinidade a albumina, e apenas 4% está em sua forma biologicamente ativa (SIITERI *et al.*, 1982). A atividade biológica de qualquer glicocorticoide é conferida pela ligação de um grupo hidroxilo na posição C11 (cortisol), por outro lado, se houver a ligação de um grupo oxi nessa posição, a enzima é inativada (cortisona). A 11 β -HSD1 ativa a cortisona através da conversão do grupo C11-oxi em C11-hidroxi, sendo que a forma inativa do cortisol representa, portanto, um reservatório desse hormônio, onde a conversão para a forma ativa é tecido-específica, dependente da expressão e atividade da 11 β -HSD1 (MONDER; SHACKLETON, 1984).

A 11 β -HSD1 desempenha, assim, papel fundamental na determinação das concentrações intracelulares de glicocorticóides, além de sua possível ação como amplificadora tecido específica da ação destes hormônios (LIVINGSTONE *et al.*, 2000; RASK *et al.*, 2001; SECKL; WALKER, 2001). O glicocorticoide ativo (cortisol

em humanos) possui função sistêmica, agindo no controle tecido específico do metabolismo da glicose, no metabolismo de aminoácidos, manutenção da pressão sanguínea, e modulação de respostas inflamatórias (FRANKS *et al.*, 2004). O cortisol ativa também a diferenciação do pré-adipócito em adipócito, aumentando consequentemente a massa adiposa visceral (STEWART; TOMLINSON, 2002).

O gene codificador da enzima 11 β -HSD1, *HSD11B*, localiza-se no cromossomo 1 (1q32.2), possui mais de 30kb de comprimento, 6 éxons e 5 íntrons (TANNIN *et al.*, 1991; GATHERCOLE *et al.*, 2013) (FIGURA 7). É amplamente expresso a partir dos 4 meses de idade, com maior expressão no fígado, tecido adiposo, gônadas e cérebro, desempenhando importante papel no aumento da concentração de cortisol nestes, e em outros tecidos, independentemente dos níveis circulantes (TOMLINSON *et al.*, 2004; GATHERCOLE *et al.*, 2013).

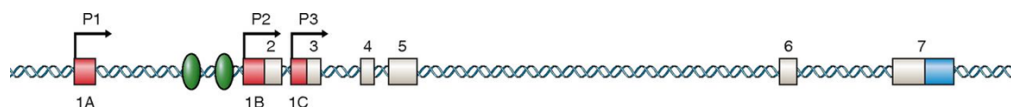


FIGURA 7: DESENHO ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA GÊNICA DE *HSD11B1*.

FONTE: Adaptado de Chapman; Holmes; Seckl (2013)

HSD11B1 é transcrito a partir de dois promotores (P1 e P2), sendo que a transcrição a partir do promotor P2 se mostrou predominante no fígado, tecido adiposo e cérebro de ratos, mas transcritos a partir de P1 também foram identificados nesses tecidos; já no pulmão, o transcrito a partir de P1 foi predominante (BRULEY *et al.*, 2006). Uma ampla gama de fatores regula os níveis de mRNA de *HSD11B1*, dentre estes, várias citocinas e hormônios, sendo que alguns com propriedades pró-inflamatórias (interleucina-1 e fatores de necrose tumoral) aumentaram os níveis de transcrito, enquanto que alguns agonistas de receptores nucleares, (estrógeno, proliferador de peroxissomo α e γ) diminuíram a sua expressão (HERMANOWSKI-VOSATKA *et al.*, 2000).

Em modelos humanos ou em roedores obesos a expressão de 11 β -HSD1 no tecido adiposo é aumentada, com redução ou manutenção de sua expressão no fígado (LIVINGSTONE *et al.*, 2000; RASK *et al.*, 2001). MASUZAKI *et al.* (2001) verificaram que um modesto aumento na atividade da enzima 11 β -HSD1 no tecido adiposo de ratos foi o suficiente para causar hiperfagia e obesidade visceral. Tais achados sugerem que o aumento da ação intra-adipócito dos glicocorticoides, por meio da elevação da concentração e/ou da atividade da 11 β -HSD1, seria um mecanismo molecular comum para a patogênese da síndrome metabólica, através da promoção da obesidade visceral, resistência insulínica, hipertensão e dislipidemia (BUJALSKA; KUMAR; STEWART, 1997; SECKL *et al.*, 2004). Esta hipótese é corroborada por estudos com ratos transgênicos, que ao super-expressar 11 β -HSD1 no tecido adiposo, adquiriram traços fundamentais da síndrome metabólica, enquanto que ratos com expressão de 11 β -HSD1 deficiente apresentaram o perfil metabólico cardioprotetivo (MASUZAKI *et al.*, 2001; MORTON *et al.*, 2001).

Dentre os dois polimorfismos investigados no presente estudo, o rs849610 G>A localiza-se no promotor P2, e possui o alelo A com menor frequência (*Minor allele Count* A=0,1010/506) (NCBI, dbSNP). Este polimorfismo, no entanto, não foi associado a mudanças transcricionais *in vitro* (MALAVASI *et al.*, 2010). O outro polimorfismo, rs12086634 T>G é encontrado no intensificador intrônico, sendo o alelo G menos frequente (*Minor allele Count*: G=0,1971/987) (NCBI, dbSNP) já tendo sido associado com baixa atividade transcricional de *HSD11B1 in vitro* (DRAPER *et al.*, 2003). Apesar da aparente falta de influência funcional do polimorfismo rs849610 isoladamente, um estudo encontrou associação da combinação alélica menos frequente destes dois SNPs (alelo A do rs849610, e alelo G do rs12086634) com níveis de mRNA e atividade da 11 β -HSD1 elevados em tecido adiposo de mulheres europeias com, e sem síndrome do ovário policístico (GAMBINERI *et al.*, 2011).

Ambos os polimorfismos já foram associados com DMT2 e/ou hipertensão em três diferentes populações, (FRANKS *et al.*, 2004; NAIR *et al.*, 2004; MORALES *et al.*, 2008), mas não com a obesidade no estudo de NAIR *et al.*

(2004). Devido à complexidade de interações dos processos metabólicos em que a enzima 11β -HSD1 está envolvida, nem sempre os resultados de estudos de associação destes dois SNPs do seu gene codificador são replicados, como demonstrou o estudo de Dujic e colaboradores que não encontrou associação do SNP 849610 com SMet em uma população da Bósnia (DUJIC *et al.*, 2012) , e o estudo de Moon *et al.* (2011) que não associou o SNP 12086634 com a SMet e diabetes tipo 2 em Coreanos (MOON *et al.*, 2011). Além da complexidade dos processos metabólicos em questão, é provável que tais discordâncias sejam também parcialmente devidas às diferenças metodológicas e às diferenças étnicas entre as populações dos diversos estudos.

2.6.1.2 Adrenoreceptor beta 2 (*ADBR2*)

Os receptores adrenérgicos (α_1a , α_1b , α_1c , α_2a , α_2b , α_2c e β_1 , β_2 , β_3) pertencem a uma grande família de receptores acoplados a proteína G. O papel da proteína G é efetivar a sinalização que foi recebida pelos receptores, assim, na ausência de estímulos, ela permanece ligada aos mesmos no meio intracelular e, quando ativadas por sinais específicos, é capaz de migrar pelo citosol e ativar as proteínas amplificadoras ou canais iônicos, ativando eventos intracelulares em resposta a sinais específicos (RANDAZZO DE MOURA; VIDAL, 2011).

As catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) são as responsáveis por ativar os receptores adrenérgicos. Elas são secretadas pelos neurônios pós-glandulares do sistema nervoso autônomo simpático, que predomina principalmente durante as respostas ativas: “luta e fuga”. Os receptores beta adrenérgicos são ligados, em sua grande maioria, ao subtipo G_s , ativadora da adenilato-ciclase, com posterior produção do AMP_c , o que lhes confere ação agonista. Noradrenalina e adrenalina são equipotentes na ativação dos receptores β_1 , já o β_2 é mais sensibilizado pela adrenalina (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006).

O metabolismo é profundamente afetado pela ativação do sistema adrenérgico, a ativação dos seus receptores provoca a lipólise e a elevação dos níveis de ácidos graxos no plasma, aumento da gluconeogênese no fígado para suprir o cérebro, inibição moderada da liberação de insulina pelo pâncreas, para conservar a glicose e deslocar o suprimento de energia para os músculos através da oxidação de ácidos graxos, respostas comuns em situações de estresse, mas que se persistirem favorecem o desenvolvimento de traços relacionados a síndrome metabólica e alterações no metabolismo lipídico (CICCARELLI *et al.*, 2013).

Todos os três adrenoreceptores beta promovem a lipólise em tecidos adiposos humanos *in vivo* (ENOCKSSON *et al.*, 1995; BARBE *et al.*, 1996), e, embora os adipócitos possuam os receptores adrenérgicos $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, o beta 2 adrenérgico (ADRB2) é o principal receptor lipolítico em adipócitos humanos (SAKANE *et al.*, 1999), sendo que defeitos na sua estimulação são responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade induzida por resistência a catecolaminas (REYNISDOTTIR *et al.*, 1994; ENOCKSSON *et al.*, 2000), efeitos prejudiciais na termogênese, oxidação lipídica e lipólise em indivíduos obesos (SCHIFFELERS *et al.*, 2001).

Genes que estão envolvidos na regulação funcional das catecolaminas possuem importância em estudos sobre a obesidade por conta do papel central que as catecolaminas desempenham no gasto energético, atuando como hormônios ou como neurotransmissores, que estimulam a mobilização lipídica e a lipólise nas células adiposas (OMIM, *Beta 2 – Adrenergic Receptor*). O gene *ADRB2*, codificador do receptor adrenérgico beta 2, localiza-se em 5q32, possui 3,4 kb e nenhum íntron (KOBILKA *et al.*, 1987). Em estudo realizado por YANG-FENG *et al.*, 1990 foi verificado que a distância entre os genes dos receptores $\alpha 1$ e $\beta 2$ é de 300Kb em humanos, sendo assim, a proximidade destes genes e a sequência de nucleotídeos altamente similar sugere que ambos possuem um processo evolutivo relacionado, provavelmente um gene ancestral comum se duplicou e originou novos genes com diferentes funções metabólicas.

Nove SNPs foram identificados dentro da região codificadora do *ADRB2*, sendo cinco deles mutações sinônimas, e quatro não-sinônimas: Arg16Gly, Gln27Glu, Val34Met, e Thr164Ile (REIHS AUS *et al.*, 1993; TOMASZEWSKI *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2002) dentre estas, as mutações abordadas no presente estudo são: Arg16Gly (rs1042713) onde o alelo G codifica a glicina (Gly) (mais comum em muitas populações), e o alelo A codifica o resíduo arginina (Arg); e o SNP Gln27Glu (rs1042714), onde o alelo C codifica a glutamina (Gln) e o alelo G o ácido glutâmico (Glu) (FIGURA 8). Quando as variantes selvagens são alteradas para Arg16 e Gln27 em células recombinantes, a função de *ADRB2* é marcadamente alterada (GREEN *et al.*, 1995), enquanto que *in vitro* a regulação negativa via agonista é aumentada em presença do alelo Gly16, e em presença do alelo Glu27 esta regulação é reduzida (GREEN *et al.*, 1995).

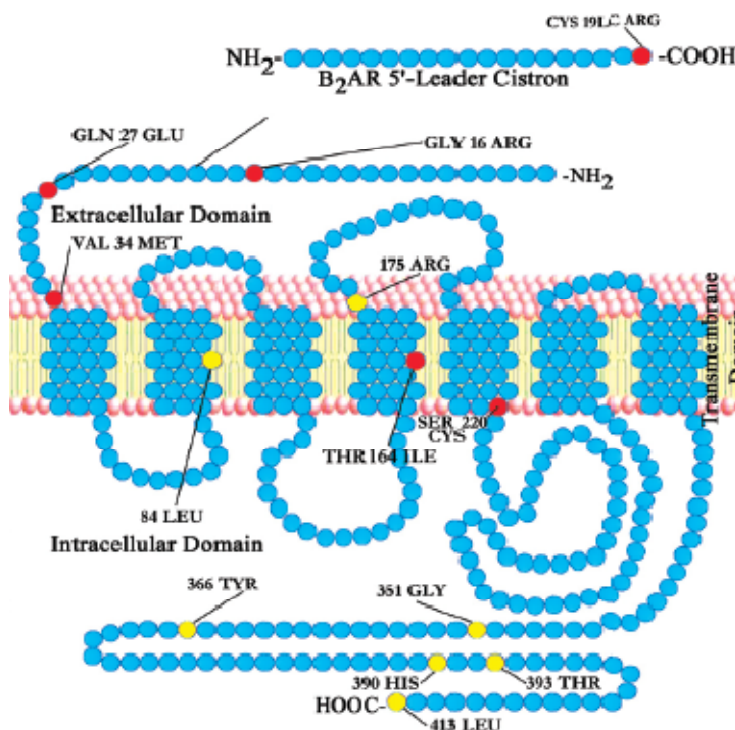


FIGURA 8 – ADRENORECEPTOR BETA 2 E SEUS POLIMORFISMOS
 FONTE: Adaptado de Taylor; Bristow (2004).

Os estudos de associação destes SNPs e variáveis relacionadas a distúrbios metabólicos e obesidade apresentam resultados inconsistentes. O polimorfismo Arg16Gly foi associado à obesidade em alguns estudos (ELLSWORTH *et al.*, 2002; GARENC *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2011), mas não em outros (LARGE *et al.*, 1997; PEREIRA; MINGRONI-NETTO; YAMADA, 2011; ZHANG; WU; YU, 2014). Assim como o SNP Gln27Glu, que foi associado à hipertrigliceridemia (IWAMOTO *et al.*, 2001) e obesidade em alguns estudos: (LARGE *et al.*, 1997; GONZÁLEZ SÁNCHEZ *et al.*, 2003; ZHANG; WU; YU, 2014); mas DUARTE *et al.* (2003) não replicou a associação com a obesidade.

Apesar das discordâncias, resultados interessantes já foram relatados. O estudo realizado por LARGE *et al.* (1997), em uma população sueca, associou o polimorfismo Gln27Glu em mulheres a um excesso de peso de aproximadamente 20 Kg, e a células de gordura aproximadamente 50% maiores que os controles. O trabalho de CORBALAN *et al.* (2002), em uma amostra populacional da Espanha, encontrou índice de massa corpórea maior entre as mulheres portadoras da variante Glu27 que realizavam atividade física, que em mulheres que não portavam o alelo Glu27, e também realizavam atividade física. Isto sugere que mulheres que possuem o alelo Glu27 não se beneficiam igualmente dos exercícios, e parecem ser mais resistentes a lipólise estimulada por catecolaminas, mesmo praticando altos níveis de atividade física.

Outras variantes podem também estar influenciando o efeito desses dois polimorfismos sobre a funcionalidade do receptor beta 2, e consequentemente contribuindo para a heterogeneidade de resultados apresentada acima. Yamada *et al.* (1999) identificaram dois sítios polimórficos na região 5'UTR do gene *ADRB2*: duas transições T para C, uma no nucleotídeo -47 e outra no nucleotídeo -20. Os autores analisaram também a associação destes polimorfismos com a obesidade em um estudo com 574 indivíduos. Verificaram que a substituição -47 T>C estava em forte desequilíbrio de ligação com a substituição -20 T>C e que ambas estavam em desequilíbrio de ligação com os polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu. Indivíduos portadores dos alelos -47C e -20C tinham maior IMC ($p = 0,007$) e maiores níveis de triglicerídeos séricos ($p = 0,015$) que os portadores dos alelos -

47T e -20T. Além disso, as frequências dos alelos -47C/-20C em pacientes diabéticos foram maiores que em controles não diabéticos ($p = 0,0005$). Os autores sugerem que a substituição na posição -47 pode alterar os níveis de expressão do gene *ADRB2*, pois resulta na substituição de uma cisteína por uma arginina na extremidade C do peptídeo líder. No entanto, estas substituições são muito raras na população em geral, o que diminui a importância do ponto de vista genético, além disso, o efeito dos polimorfismos abordados neste estudo foi comprovado por GREEN *et al.* (1995 e 1996); e KORYAKINA *et al.* (2012), que verificaram a interferência dos mesmos na extensão da regulação negativa exercida pelos agonistas sobre os receptores beta-adrenérgicos (processo de dessensibilização).

2.6.1.3 Adrenoreceptor beta 3 (*ADBR3*)

O receptor adrenérgico beta 3 foi o mais recentemente descoberto (EMORINE *et al.*, 1989), e compartilha muitas características com os demais adrenoreceptores, inclusive a estimulação por adrenalina e noradrenalina, sendo que, ao contrário do beta 2, possui maior afinidade pela noradrenalina (STROSBURG; PIETRI-REUXEL, 1996). Este receptor é expresso principalmente no tecido adiposo, atuando como mediador da lipogênese no tecido adiposo visceral e subcutâneo, e da termogênese no tecido adiposo marrom, ambas funções desempenhadas em resposta a estimulação por catecolaminas (STROSBURG; PIETRI-REUXEL, 1996).

Além de possuírem funções diferentes, os tecidos adiposos marrom e branco diferem quanto a forma de estocagem de gordura: a gordura branca é armazenada em grandes adipócitos; já a gordura marrom se localiza no interior de pequenos adipócitos, contendo uma quantidade reduzida de triglicerídeos em gotículas lipídicas multi-lobulares, tendo alta densidade de mitocôndrias (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Embora o tecido adiposo branco esteja

associado à lipólise, que possui relação direta com o gasto energético, a termogênese desempenhada pelo tecido adiposo marrom também influencia na energia despendida (VAN MARKEN *et al.*, 2009; NEDERGAARD; CANNON, 2010). Recentemente, a relevância fisiológica do tecido adiposo marrom tomou nova proporção, tendo em vista estudos que encontraram depósitos deste tecido funcionalmente ativos em adultos, sendo que a sua quantidade foi maior em mulheres e inversamente correlacionada com o IMC (CYPESS *et al.*, 2009), evidenciando seu papel funcional no metabolismo energético. Porém, os possíveis efeitos das variações na funcionalidade do receptor adrenérgico beta 3 nesse tipo específico de tecido adiposo ainda são pouco compreendidos.

Foi relatado que a estimulação do receptor $\beta 3$ induz a uma variedade de efeitos metabólicos como aumento da oxidação de gordura, aumento de gasto energético e melhoria da captação de glicose mediada por insulina em modelos de roedores (JIN *et al.*, 2011).

O gene codificador do receptor adrenérgico beta 3 (*ADBR3*) localiza-se em 8p11.23, e apresenta dois éxons e um íntron (GRANNEMAN; LAHNERS.; CHAUDHRY, 1993). O polimorfismo investigado nesse estudo (Trp64Arg - rs4994) possui o aminoácido Arginina na posição 64 da proteína quando o alelo correspondente é C, e quando o alelo é T, possui o resíduo triptofano. Esse polimorfismo se localiza no primeiro *loop* intracelular do receptor (FIGURA 9), e o alelo 64Arg é menos frequente na maioria das populações: é encontrado em 13% dos Mexicanos-americanos; 12% em Afro-americanos; 8% em Caucasianos (WALSTON *et al.*, 1995), mas possui frequência alta entre os Índios Pima (31%), sugerindo que esse alelo poderia estar contribuindo para a alta incidência de obesidade e diabetes nessa população (YOSHIDA; SAKANE; UMEKAWA, 1995; BELFER *et al.*, 2005). Esquimós também apresentam frequência elevada desse alelo, 38%, (BIERY *et al.*, 1997), o que pode sugerir alguma relação com a termogênese.

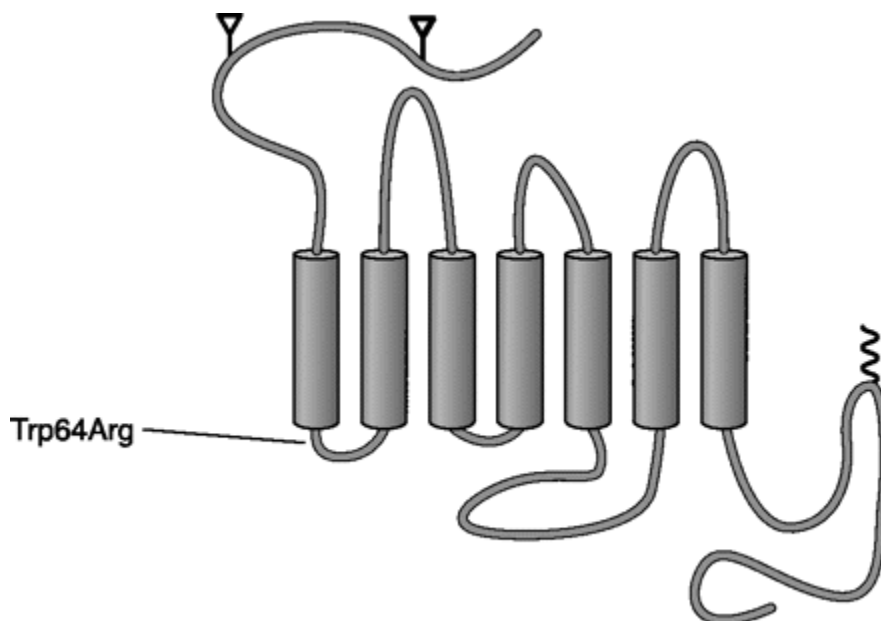


FIGURA 9 – ADRENORECEPTOR BETA 3 E A POSIÇÃO DO POLIMORFISMO Trp64Arg
 FONTE: Adaptado de Dorn II (2010)

Possivelmente devido às diferenças nas frequências alélicas desse polimorfismo nos diferentes grupos étnicos, resultados contraditórios vêm sendo gerados em estudos que procuram associar a variante a distúrbios metabólicos. O SNP Trp64Arg já foi associado com a obesidade (KIM *et al.*, 2004; STAIANO; KATZMARZYK, 2012), acúmulo de gordura visceral (TCHERNOF *et al.*, 2000; BRACALE *et al.*, 2007; OGURI; TACHI; MATSUOKA, 2013), resistência insulínica (KADOWAKI *et al.*, 1995; WIDEN *et al.*, 1995), diabetes do tipo 2 (KNOWLER, 1996). Outros estudos, porém, não evidenciaram essas associações (ODAWARA; SASAKI; YAMASHITA, 1996; RISSANEN *et al.*, 1997; STROSBERG, 1997).

A população japonesa, em particular, parece ser especialmente afetada por esse polimorfismo, visto a sua alta frequência (OGURI; TACHI; MATSUOKA, 2013) e a sua tendência ao acúmulo de gordura visceral em detrimento a gordura gluteofemoral (ginóide) (STAIANO; KATZMARZYK, 2012). Um estudo nesta população relatou que o SNP Trp64Arg está associado à redução de 200 kcal/d na taxa de metabólica em repouso (CLÉMENT *et al.*, 1995), favorecendo portanto o

acúmulo de gordura. Alguns autores sugerem que esse polimorfismo possa ser utilizado como um possível marcador para a obesidade visceral e síndrome metabólica (YOSHIDA *et al.*, 1995; SAKANE *et al.*, 1997a; SAKANE *et al.*, 1997b).

Porém, é preciso cautela na interpretação dos estudos de associação com os SNPs em genes codificadores de receptores adrenérgicos, visto que o estilo de vida, incluindo fatores estressores e a rotina de exercícios físicos, são variáveis que influenciam diretamente nos níveis das catecolaminas, o que se refletirá também nas consequências funcionais associadas às variantes alélicas dos seus receptores.

2.6.1.4 Adiponectina (*ADIPOQ*)

A adiponectina é a mais abundante adipocina encontrada no plasma: representa 0,01% do total de proteínas circulantes, o que corresponde ao triplo da quantidade encontrada de leptina (WHITEHEAD *et al.*, 2006). Ela foi originalmente identificada e nomeada por quatro grupos independentes Acrp30 (SCHERER *et al.*, 1995), AdipoQ (HU; LIANG; SPIEGELMAN, 1996), apM1 (MAEDA *et al.*, 1996) e GBP28 (NAKANO *et al.*, 1996), há cerca 20 anos atrás.

Ao contrário do que seria de se esperar, a sua concentração plasmática é reduzida com o aumento da quantidade de tecido adiposo (ARITA *et al.*, 1999), sendo que níveis mais baixos são encontrados também em diabéticos (WEYER *et al.*, 2001), hipertensos (ADAMCZAK *et al.*, 2003) e em portadores de doenças coronarianas (KUMADA *et al.*, 2003). O fato da concentração plasmática deste hormônio decrescer com o avanço dessas patologias o torna um possível alvo de intervenções, em que a reposição da adiponectina poderia melhorar a resistência insulínica associada à obesidade e quadros de aterosclerose (HALUZÍK; PAŘÍZKOVÁ; HALUZÍK, 2004).

A adiponectina desempenha uma função protetora sistêmica, modulando a sensibilidade a insulina, os processos inflamatórios e aterogênicos (FERGUSON

et al., 2010). A importância desta adipocina para o metabolismo da glicose é tamanha que os seus níveis, em conjunto com o IMC, explicaram 73% da variância na sensibilidade insulínica observada em adolescentes obesos (BACHA *et al.*, 2004).

Estudos funcionais desenvolvidos em animais modelos indicam que a adiponectina atenua a resistência insulínica através da redução do conteúdo de triacilglicerol nos músculos e no fígado (YAMAUCHI *et al.*, 2001). Os mecanismos pelos quais a adiponectina ativa esta oxidação incluem a inativação da Acetil-CoA-carboxilase (ACC) e a ativação da via proteína kinase ativada-AMP (AMPK), que pode ser considerada um “sensor de combustível das células”. Quando a quantidade de energia no interior das células diminui, a razão AMP/ATP aumenta, e então a AMPK é fosforilada e ativada. Já foi demonstrado que a adiponectina é um dos fatores ativadores da via AMPK, e esta ativação provoca o aumento da oxidação e diminuição da esterificação dos AGLs em triglicerídeos, diminuindo assim a estocagem do mesmo no tecido adiposo e em outros tecidos (TOMAS *et al.*, 2002).

O aumento da oxidação dos AGLs inibe a gluconeogênese e intensifica os efeitos da insulina. Camundongos deficientes em adiponectina desenvolveram resistência a insulina em resposta a uma dieta rica em gordura e açúcares (MAEDA *et al.*, 2002), enquanto que camundongos com altas concentrações da proteína não exibiram resistência insulínica (COMBS *et al.*, 2004).

Efeitos benéficos da adiponectina sobre quadros de aterosclerose são também descritos, ela parece atuar na supressão da proliferação e migração das células musculares lisas nas artérias, através da ligação direta a fatores de crescimento derivados das plaquetas (ARITA *et al.*, 2002). Foi atribuída a ela também a inibição da transformação dos macrófagos em células espumosas, através da redução da expressão de receptores de varredura de macrófagos de classe A (OUCHI *et al.*, 2001).

O gene *ADIPOQ*, codificador da adiponectina, está localizado no cromossomo 3 (3q27), sendo constituído por 3 exons e 2 íntrons, totalizando 16Kb (TAKAHASHI *et al.*, 2000) (FIGURA 10). Codifica para um polipeptídeo com 244

aminoácidos, que possui homologia de sequência do seu domínio globular com as proteínas C1q, e homologia estrutural com as proteínas da família de citocinas TNF- α (HALUZÍK; PAŘÍZKOVÁ; HALUZÍK, 2004). A adiponectina é expressa exclusivamente no tecido adiposo branco e em alguns tipos de tecido adiposo marrom (VIENGCHAREUN *et al.*, 2002) e sua expressão é regulada por uma série de fatores endócrinos e ambientais. Foi descrito que ela decresce pelos estímulos de glicocorticóides, agonistas β adrenérgicos, TNF- α , testosterona e aumenta pela perda de peso, exposição ao frio, adrenalectomia, e fator de crescimento insulina-símile-1(IGF-1), consumo de ácidos graxos poliinsaturados n3 marinhos, exercícios físicos e estrogênio (FASSHAUER *et al.*, 2002; SAUNDERS *et al.*, 2012; SALEH *et al.*, 2013). Devido à influência dos hormônios esteroides, os níveis de adiponectina apresentam dimorfismo sexual, as mulheres possuem níveis mais elevados comparados aos homens (HALUZÍK; PAŘÍZKOVÁ; HALUZÍK, 2004).

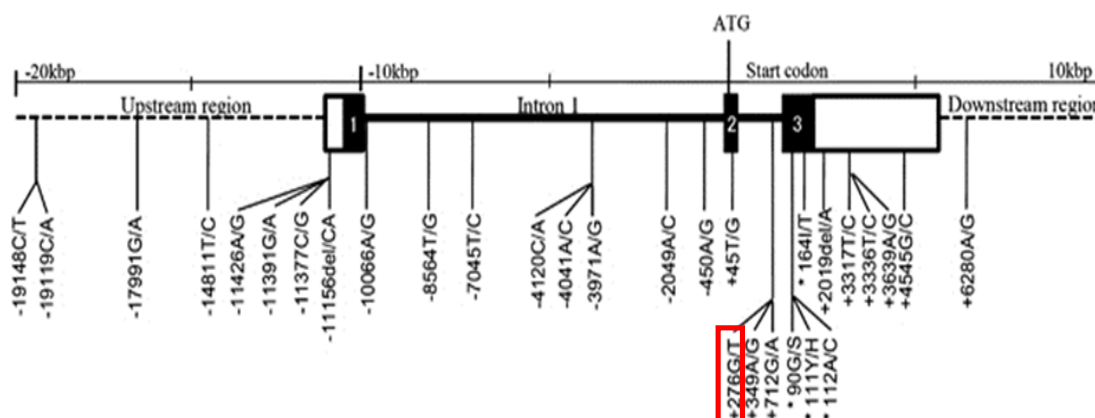


FIGURA 10 – ESQUEMA REPRESENTANDO A ESTRUTURA GÊNICA DE *ADIPOQ* E A LOCALIZAÇÃO DO POLIMORFISMO INVESTIGADO

FONTE: Adaptado de Tanimura *et al.* (2010)

Estudos GWA (*Genome Wide Association*) identificaram alguns SNPs no gene *ADIPOQ* que também são responsáveis pela variação nos níveis séricos de adiponectina (POLLIN *et al.*, 2005; HEID *et al.*, 2006; HEID *et al.*, 2010). Dentre

estes, o polimorfismo investigado no presente estudo: rs1501299 (276G>T), localizado no íntron 2. O alelo T deste SNP já foi associado à hipoadiponectinemia (CHEUNG *et al.*, 2014), porém, devido à complexidade de fatores que controlam a expressão de adiponectina, resultados diversos são encontrados quanto ao efeito específico dos alelos na variação nos níveis séricos da proteína, quanto à associação de variantes alélicas e traços associados a síndrome metabólica. Além disso, muitos estudos não conseguem estabelecer uma relação direta entre a hipoadiponectinemia e distúrbios metabólicos (GABLE; HUREL; HUMPHRIES, 2006; HEID *et al.*, 2006; LARA-CASTRO *et al.*, 2007).

Alguns estudos encontraram a associação deste SNP com variáveis metabólicas e doenças associadas: Portadoras do alelo T (menos frequente) apresentaram maiores níveis de insulina e HOMA-IR (*Homeostatic model Assessment*) (método usado para quantificar a resistência insulínica e função das células β) comparadas às portadoras do genótipo GG, em um estudo com mulheres gregas (MELISTAS *et al.*, 2009); o mesmo alelo (T) também foi considerado um fator de risco independente para a ocorrência de acidente vascular cerebral por intermédio do aumento da rigidez arterial, além de ser também correlacionado a dislipidemia em 353 pacientes hipertensos (KAWAI *et al.*, 2013), demonstrando o possível efeito prejudicial desse alelo sobre o metabolismo lipídico. Em um estudo do tipo caso-controle mais recente, esse polimorfismo também foi associado ao DMT2 em uma amostra turca (ARIKOGLU *et al.*, 2014).

Porém, a repetição desse efeito nem sempre é encontrada, como demonstrou o estudo baseado em uma meta-análise de 35 trabalhos anteriormente publicados que não encontrou nenhuma associação deste SNP com a pressão sanguínea e lipoproteínas (ZHAO, T.; ZHAO, J., 2011), assim como o estudo de Al-Daghri *et al.* (2012) que não associou o SNP com DMT2, hipertensão, ou dislipidemias em uma amostra saudita.

Autores sugerem que essa falta de consenso nos resultados de estudos de associação pode ser devido a diferenças étnicas (AL-DAGHRI *et al.*, 2012), que se refletem não só em diferenças de frequências alélicas do SNP 276G>T, como

também em diferenças alélicas em outros polimorfismos no gene *ADIPOQ*, cujos efeitos poderiam ser ainda maiores, como já foi considerado por alguns pesquisadores que acreditam que o SNP276G>T seria um marcador próximo a outro polimorfismo que teria então efeito direto. Além disso, padrões de variação específicos em outros genes, que também influenciam as vias metabólicas energéticas, somados ainda aos hábitos de vida característicos de cada população, podem contribuir para a variabilidade de resultados observada.

2.6.1.5 Grelina (*GHRL*)

A grelina é um peptídeo de 28 aminoácidos identificado em 1999 no estômago de ratos (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999) e que posteriormente foi detectado em menor quantidade em vários outros tecidos (VAN DER LELY *et al.*, 2004). A grelina pode ser encontrada na circulação de duas formas: desacilada (forma na qual é secretada e mais abundante no plasma) e acilada (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999). A acilação é catalisada pela enzima grelina-O-acil-transferase, que insere o grupamento acil, originado dos ácidos graxos ingeridos, no resíduo de serina 3, dessa forma, a quantidade de gordura ingerida afeta diretamente os níveis de grelina acilada circulantes (GUTIERREZ *et al.*, 2008). A acilação permite a passagem da grelina pela barreira hemato-encefálica e a torna ativa na estimulação da secreção do hormônio de crescimento (BEDNAREK *et al.*, 2000). Já a forma desacilada possui funções não ainda totalmente compreendidas, mas não é uma forma inativa, pelo contrário, desempenha funções cardioprotetoras e antiproliferativas (CASSONI *et al.*, 2001).

As funções da grelina são diversificadas, sendo responsável por estimular a secreção do hormônio de crescimento, a liberação do hormônio prolactina e do adrenocorticotrópico, influenciar o eixo hipófise-gonadal, estimular o apetite, influenciar o sono, controlar a mobilidade gástrica e modular a função pancreática (VAN DER LELY *et al.*, 2004). Estudos em roedores demonstraram que a

administração central ou periférica da grelina reduz a oxidação de ácidos graxos, em paralelo com o aumento da ingesta de alimentos, aumentando dessa forma a adiposidade (TSCHOP; SMILEY; HEIMAN, 2000).

A forma acilada da grelina atua sobre o receptor do secretagogo do hormônio de crescimento GH (*growth hormone*) (GHS-R1a) no sistema nervoso central, e estimula a liberação de GH, sendo esta a primeira função descrita desta proteína. No entanto, outras funções independentes da liberação de GH foram tornando-se conhecidas, hoje sabe-se dos seus efeitos lipogênicos e orexigênicos, também via estimulação do GHS no sistema nervoso central (TSCHOP; SMILEY; HEIMAN, 2000; NAKAZATO *et al.*, 2001).

A estimulação do apetite e a ingesta preferencial por gordura mediada pela grelina ocorre por vias hipotalâmicas complexas, no centro do apetite, através da estimulação do neuropeptídeo Y, das proteínas relacionadas a agouti (AGRP), ambos orexigênicos, e dos neurônios produtores de orexina (COWLEY *et al.*, 2003; KORBONITS *et al.*, 2004). Justamente por esta ação, seus níveis circulantes durante jejuns prolongados e hipoglicemia são altos, decrescendo após as refeições (SALBE *et al.*, 2004). Esta oscilação nos níveis de grelina parece responder ao tipo de nutriente ingerido, e não necessariamente a sua quantidade. Refeições ricas em carboidratos reduzem a concentração de grelina circulante e elevam a concentração de insulina, enquanto que refeições baseadas em proteínas de origem animal e lipídeos foram associadas a altos níveis de grelina e discreto aumento na concentração de insulina (ERDMANN *et al.*, 2004; SALBE *et al.*, 2004).

Além desta oscilação em resposta a ingesta de alimentos em curto prazo, os níveis de grelina também respondem a estados nutricionais crônicos, mostrando-se reduzidos em indivíduos obesos (TSCHOP *et al.*, 2001), e elevados em indivíduos com anorexia nervosa, retornando a níveis normais após a recuperação da saúde (TANAKA *et al.*, 2003).

A expressão das duas formas da grelina, e também a do seu receptor (GHSR), nas células pancreáticas α e β sugerem uma ação autócrina ou parácrina no pâncreas (KAGEYAMA *et al.*, 2005), porém seu efeitos sobre o metabolismo de

carboidratos não estão totalmente elucidados, além disso, as duas formas parecem ter efeitos diferentes (HEPPNER; TONG, 2014). De forma geral, a grelina acilada parece ter ação inibitória sobre a secreção de insulina estimulada pela glicose, diminuindo também o consumo de glicose pelos tecidos, por outro lado, quando esta forma da grelina está ausente, obtêm-se melhora da tolerância à glicose, e aumento na secreção de insulina (LIU *et al.*, 2008; BARNETT *et al.*, 2010). Quanto à forma desacilada da grelina, apesar de se conhecer menos dos seus mecanismos de ação, alguns autores propõem uma ação antagonista à grelina acilada, com ação na melhora da tolerância a glicose e aumento da secreção de insulina, enquanto outros acreditam que ela não desempenhe papel no metabolismo da glicose (HEPPNER; TONG, 2010).

Devido a estudos que sugerem que a grelina influencia em longo prazo a regulação do peso corporal, e do seu papel como marcador de estado nutricional, (ARIYASU *et al.*, 2002; HOLDSTOCK *et al.*, 2003; PALIK *et al.*, 2007), é relevante a compreensão da sua atuação nos distúrbios associados a síndrome metabólica (MA *et al.*, 2011).

O gene da grelina (*GHRL*) localiza-se no cromossomo 3 (3p26-25) sendo constituído por quatro éxons e três íntrons (WAJNRAJCH *et al.*, 2000). O polimorfismo selecionado para o presente estudo é o Leu72Met (rs696217), em que há a substituição de uma guanina (G) no nucleotídeo 408 por uma timina (T) em baixa frequência (T=0,0833/417 *Minor Allele Count* NCBI), fora da região codificadora da grelina madura. Esta substituição leva a alteração do aminoácido 72 (leucina para metionina) da proteína (UKKOLA *et al.*, 2001) (FIGURA 11).

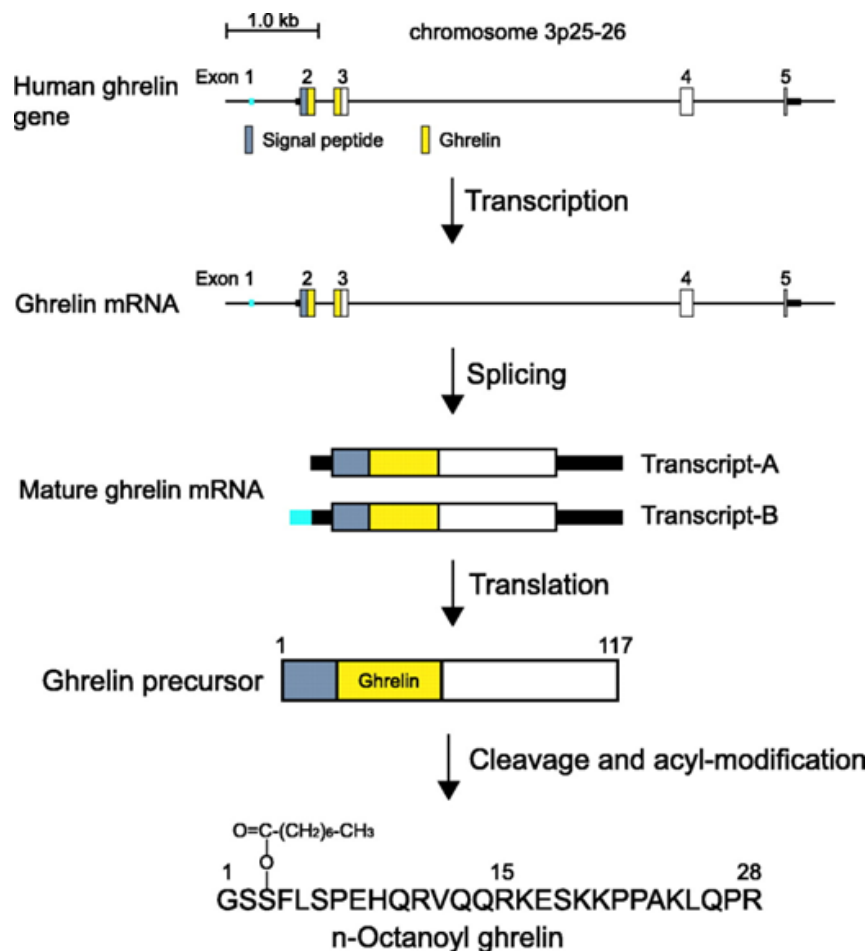


FIGURA 11 – GENE GRELINA E SEUS PROCESSAMENTOS

FONTE: Adaptado de Kojima; Kangawa (2005)

Ukkola e colaboradores (2001) descreveram essa mutação em um estudo com 15 indivíduos obesos, dos quais 3 eram homozigotos (TT) e 12 eram heterozigotos (GT), e 12 indivíduos controles, todos heterozigotos. Nesse estudo encontraram que o alelo Met72 pode estar relacionado à obesidade precoce. Da mesma forma, Korbonits e colegas (2002) associaram este mesmo alelo a valores maiores de IMC em crianças obesas, e com menor secreção de insulina durante a primeira parte do teste oral de tolerância a glicose, sugerindo que o alelo pode influenciar o metabolismo da glicose. Os autores também associaram o alelo ao aparecimento da obesidade mais cedo: portadores do alelo mutado desenvolveram a obesidade 1,5 anos mais cedo que o grupo não portador.

O alelo Met72 já foi também associado à síndrome metabólica (XU *et al.*, 2008), e a alguns dos seus traços, como demonstra o estudo de Steinle *et al.* (2005), que encontrou altos níveis de glicose em jejum e de triglicerídeos, e baixos níveis de colesterol HDL, além de maior prevalência da SMet associados à variante 72Met, em uma amostra de indivíduos idosos pertencentes a comunidade *Amish*. Apresentando resultados contrários, um estudo com indivíduos dinamarqueses não encontrou associação do polimorfismo Leu72Met com acúmulo de gordura visceral, ou parâmetros do metabolismo da insulina e glicose (BING *et al.*, 2005). Da mesma forma, não há consenso quanto a associação desse polimorfismo e a obesidade. Hinney *et al.* (2002) não encontraram influência do SNP L72M na regulação do peso corpóreo, assim como Mager *et al.* (2006). Dantas *et al.* (2011) também não encontraram associação direta de Leu72Met e o IMC em uma amostra de Euro-Brasileiros, mas identificaram a influência desse SNP sobre a atividade enzimática da butirilcolinesterase (BChE), já anteriormente associada a fatores de risco metabólicos em um estudo de GWA (BENYAMIN *et al.*, 2011).

Sendo assim, este polimorfismo pode ter também efeitos indiretos sobre o metabolismo, sendo que dentre os principais resultados já encontrados destacam-se sua influência sobre a idade de início da obesidade e de distúrbios metabólicos.

2.6.1.6 Perilipina 4 (*PLIN4*)

As gotículas de lipídeos, estocadas principalmente dentro dos adipócitos, são formadas por triglicerídeos e ésteres de colesterol, recobertos por uma única camada de fosfolipídeos e proteínas com funções regulatórias. Essas proteínas de revestimento são representadas por pelo menos um membro da família PAT (PAT é o acrônimo das proteínas perilipinas, proteína relacionada com a diferenciação adiposa (ADRP), e proteína de interação de cauda de 47kDa (TIP-47)), os membros dessa família caracterizam-se por possuírem uma sequência de

aminoácidos similar e conservada (LONDOS *et al.*, 2005), e comum afinidade por gotículas de estoque de lipídeos intracelulares (LU *et al.*, 2001).

Dentre os três membros originais da família PAT, a perilipina é a mais bem caracterizada. A perilipina é uma fosfoproteína localizada na superfície das gotículas de lipídio contidas dentro dos adipócitos, células produtoras de esteróides, e placas ateroscleróticas rompidas, desempenhando papel fundamental na regulação celular de deposição e mobilização de triglicerídeos (TAI; ORDOVAS, 2007). A perilipina facilita a formação e o armazenamento de lipídios (inibindo a lipólise) em gotículas, bem como pode favorecer a lipólise quando estimulada por catecolaminas (DERAM *et al.*, 2008). A perilipina impede o acesso das enzimas responsáveis pela lipólise, principalmente a lipase sensível a hormônios (LSH) (sensível principalmente a insulina e catecolaminas), diminuindo dessa forma a velocidade da lipólise. Quando a perilipina é fosforilada pela proteína Kinase A (PKA), em resposta a ligação das catecolaminas aos receptores beta adrenérgicos, a perilipina muda de conformação permitindo o acesso aos triglicerídeos estocados (TANSEY *et al.*, 2004). Um estudo com camundongos silenciados para o gene da perilipina permitiu observar que estes se tornaram resistentes à obesidade induzida pela dieta, tiveram redução da gordura corporal, e paradoxalmente desenvolveram um risco aumentado para a intolerância à glicose e resistência periférica à insulina (TANSEY *et al.*, 2001).

O estudo das proteínas da família PAT é relativamente recente, e devido ao avanço do entendimento das suas particularidades, algumas mudanças de nomenclatura e classificação foram adotadas. A denominação da proteína relacionada com a diferenciação adiposa (ADRP) tornou-se imprópria com o avanço das pesquisas, considerando que esta proteína é degradada durante a diferenciação dos adipócitos, e expressa em adipócitos maduros (BRASAEMLE *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2005). Ela então passou a ser denominada adipofilina, o que mais uma vez como avanço das pesquisas tornou-se inadequado, considerando que trabalhos demonstraram que a proteína é expressa em vários outros tipos celulares (HEID; SCHNOLZER; KEENAN, 1996; HEID *et al.*, 1998). Quanto ao TIP47, estudos sugerem que ele atuaria como uma proteína de triagem da relação

entre os compostos secretados dos endossomos e do complexo de Golgi (DIAZ; PFEFFER, 1998), devido a sua alta similaridade com ADRP, TIP47 também foi incluso na família PAT (KIMMEL *et al.*, 2010).

Por último, duas outras proteínas foram incorporadas a família PAT: a S3-12 e a LSDP5, devido as suas similaridades de sequência e as suas funções associadas às gotículas de armazenamento de lipídeos (SCHERER *et al.*, 1998; DALEN *et al.*, 2007).

Devido às inadequações de nomenclatura, e a inserção de novos elementos na família PAT, no ano de 2010 foi incorporada uma nova nomenclatura para as proteínas desta família, e seus respectivos genes (KIMMEL *et al.*, 2010). Essa nova regra unificou todos os cinco membros sob a denominação única de perilipina (PLIN), e o que os difere é a numeração subsequente: PLIN1, PLIN2, PLIN3, PLIN4 e PLIN5 (Tabela 5).

TABELA 5 – NOMENCLATURA E LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DAS PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PAT

Simbolo aprovado	Nome aprovado	Nomenclatura anterior	Localização cromossômica
PLIN1	perilipina 1	perilipina, PERI, PLIN	15q26
PLIN2	perilipina 2	ADRP, ADFP, adipofilina	9p22.1
PLIN3	perilipina 3	TIP47, PP17, M6PRBP1	19p13.3
PLIN4	perilipina 4	S3-12	19p13.3
PLIN5	perilipina 5	PAT11, LSDP5, OXPAT, MLDP	19p13.3

FONTE: Adaptado de KIMMEL *et al.* (2010).

O papel da perilipina 1 (PLIN1) já é melhor compreendido, sendo que vários estudos objetivaram relacionar genótipos de *PLIN1* com fatores de risco metabólicos, apresentando resultados consistentes quanto a sua influência na obesidade e complicações associadas (NISHIU; TANAKA; NAKAMURA, 1998;

MOTTAGUI-TABAR *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2004a; QI *et al.*, 2004b) . Por outro lado, PLIN4 parece ser uma proteína também de fundamental importância nos processos de lipólise e estocagem de lipídeos, e apesar de escassos, os estudos de associação das variantes gênicas de *PLIN4* apresentam resultados promissores.

A perilipina 4 é expressa principalmente nos adipócitos, e realoca os lipídios para a formação de gotículas quando estimuladas com insulina e oleato. Adipócitos cultivados em oleato apresentaram duas populações distintas de gotículas lipídicas, uma composta por pequenas gotículas recobertas por PLIN4, concentradas na periferia da célula, apresentando propriedades que sugerem que eram preenchidas com triglicerídeos recém-sintetizados. A outra população observada era composta por gotículas grandes, perinucleares, recobertas por PLIN1 (WOLINS *et al.*, 2003). Após a remoção destes compostos, PLIN4 retorna ao seu estado basal, localizando-se na periferia da célula, o que sugere que ela facilitaria a absorção de ácidos graxos livres do sangue para o interior das gotículas de estoque de lipídios, em resposta ao estado nutricional da célula (WOLINS *et al.*, 2003; MARINESCU *et al.*, 2005).

O gene da perilipina 4 (*PLIN4*) em humanos possui a seguinte localização cromossômica: 19p13.3 (NAGASE; KIKUNO; OHARA, 2001). As regiões promotoras de *PLIN1* e *PLIN4* possuem um sítio conservado e funcional para o receptor ativador de proliferação de peroxissomos (PPAR), que constituem uma família de receptores de fatores transcricionais que modulam muitos aspectos do metabolismo lipídico (SCHOONJANS *et al.*, 1996). Dentre seus ligantes destacam-se os ácidos graxos poli-insaturados, o que indiretamente sugere que *PLIN1* e *PLIN4* são regulados a nível transcricional pelo conteúdo lipídico da dieta (RICHARDSON *et al.*, 2011).

O polimorfismo escolhido para ser investigado no presente estudo (rs8887 G>A11482) localiza-se na região 3'UTR de *PLIN4*. Richardson e colaboradores (2011) demonstraram por meio de um estudo combinado, incluindo meta-análises e análises *in silico* e *in vitro*, que o alelo raro (A) do polimorfismo rs8887 foi associado com maior adiposidade, e que este alelo interage com os ácidos graxos

poli-insaturados da dieta, modulando padrões antropométricos, já que portadores do alelo com alto consumo de ácidos graxos poli-insaturados n3 (alto consumo de ácidos graxos ômega 3) apresentaram diminuição de variáveis antropométricas, comparados aos não portadores (RICHARDSON *et al.*, 2011).

A análise *in silico* da sequência 3'UTR de *PLIN4* ao redor do polimorfismo rs8887 contendo o alelo A, neste mesmo estudo, indicou um sítio de ligação para o microRNA-522 (miR-522). Dados obtidos a partir de ensaios com repórter luciferase demonstraram que a região 3'UTR, contendo o alelo raro A, apresentou 20% de redução no sinal da luciferase na presença de miR-522, comparado ao controle, indicando que a presença do alelo A no sítio polimórfico rs8887 permite que o miR-522 se ligue e reprima parcialmente a expressão da luciferase. Os autores concluíram, portanto, que o alelo raro do polimorfismo rs8887 pode induzir a redução em até 20% do nível de *PLIN4*, graças a criação de um sítio de ligação para miR-522 na região 3'UTR do gene, o que poderia ter ocasionado a elevação dos traços antropométricos entre os portadores do alelo A, observada na meta-análise dos estudos de associação (RICHARDSON *et al.*, 2011).

Seria de se esperar que a capacidade reduzida de *PLIN4* “empacotar” os triglicerídeos nos adipócitos teria um efeito oposto, no entanto, os meios pelos quais a redução na expressão de *PLIN4* pode levar ao aumento da adiposidade são ainda desconhecidos, e certamente passam por múltiplas vias que podem incluir um comportamento compensatório das outras perilipinas, e prover uma hipótese alternativa para esse mecanismo (SMITH; ORDOVÁS, 2012).

3 OBJETIVOS

Geral

Avaliar a influência das variantes rs1042714 e rs1042713 do gene *ADBR2*, rs4994 do gene *ADBR3*, rs846910 e rs12086634 do gene *HSD11B1*, rs8887 do gene *PLIN4*, rs696217 do gene *GHRL* e rs1501299 do gene *ADIPOQ* sobre variáveis antropométricas, bioquímicas e de imagem consideradas como fatores de risco para a síndrome metabólica.

Específicos

- 1) Comparar as médias das variáveis antropométricas obtidas entre os portadores dos diferentes genótipos das variantes genéticas investigadas.
- 2) Comparar as médias das variáveis bioquímicas obtidas entre os portadores dos diferentes genótipos das variantes genéticas investigadas.
- 3) Comparar as médias das variáveis de imagem obtidas entre os portadores dos diferentes genótipos das variantes genéticas investigadas.
- 4) Comparar as médias dos parâmetros preditores de risco para SMet estratificadas por gênero.
- 5) Verificar a contribuição das variantes genéticas, da idade e do gênero na determinação dos níveis e medidas de variáveis bioquímicas, antropométricas e de imagem obtidas da amostra estudada.
- 6) Calcular frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos estudados e compará-las entre as categorias de risco para as variáveis estudadas.

4 JUSTIFICATIVA

Apesar da possibilidade de se desenvolver uma medicina individualizada, a qual se vislumbrou com o conhecimento acerca do genoma humano, muitas vezes o gênero é ignorado em experimentos que são a base para diagnósticos específicos e tratamentos ao nível individual (MILLER; RECKELHOFF; SIECK, 2014). Historicamente, a atenção acerca das diferenças sexuais em estudos que não visam os sistemas regulatórios reprodutivos recebeu menos atenção que experimentos focados nos contextos reprodutivos (MILLER; RECKELHOFF; SIECK, 2014).

Atualmente, o efeito do gênero sobre diversos contextos nos estudos de associação e moleculares vem ganhando destaque e importância (MILLER; RECKELHOFF; SIECK, 2014; GOURLAT *et al.*, 2015), uma vez que é impossível assumir que diferenças entre homens e mulheres, desde as mais prematuras, ainda no desenvolvimento embrionário, até as mais tardias, após a influência dos hormônios sexuais, não acarretem em implicações para o curso, diagnóstico e tratamento de muitas doenças (POLLITZER, 2013).

Mesmo que homens e mulheres compartilhem muito de sua informação genética, a suscetibilidade e a incidência da maioria das patologias diferem entre eles (ORDOVÁS, 2007). A síndrome metabólica, por sua vez, apresenta fatores de risco que variam em natureza e grau de importância entre os sexos (KUPELIAN *et al.*, 2006; GEER; SHEN, 2009; BRAND *et al.*, 2014; SRINIVAS *et al.*, 2015).

Além das diferenças basais em fatores fisiológicos que compõem a SMet, os polimorfismos em genes que conferem suscetibilidade a ela também parecem exercer efeitos diferenciais em homens e mulheres, como resultado possivelmente das interrelações entre os hormônios sexuais, genes, e os seus produtos atuantes nas vias do metabolismo energético. (KHABOUR *et al.*, 2013; CHEUG *et al.*, 2014). Isto indica que a interação entre genes, fatores ambientais e gênero pode modular a suscetibilidade aos fatores que compõem a SMet, sendo que a

identificação destas particularidades pode agregar conhecimento aos esforços na busca de mecanismos de prevenção e tratamento mais eficazes, configurando avanço em termos de saúde pública.

Buscando abranger o maior número possível de variáveis, considerando que se trata do estudo de uma doença complexa, e verificar a possível influência do gênero, o presente estudo derivou de uma parceria entre o Departamento de Educação Física (Núcleo de Qualidade de Vida) e o Departamento de Genética (Laboratório de Polimorfismos e Ligação) da UFPR. Esta integração possibilitou desenvolver um estudo interdisciplinar, com a interface de áreas diferentes, porém com enfoques complementares, no sentido de desenvolver um trabalho que contribua com o conhecimento acerca das associações entre variantes genéticas de suscetibilidade e componentes isolados da síndrome metabólica, considerando eventuais diferenças associadas ao gênero.

CAPÍTULO I

Gender-dependent association of HSD11B1 single nucleotide polymorphisms with glucose and HDL-C levels

Artigo publicado em: Genetics and Molecular Biology, v. 37, 3, p.490-495 (2014).

Luciane Viater Turek^a, Neiva Leite^b, Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza^a, Jovana Karoline Lima^a, Gerusa Eisfeld Milano^b, Luciana da Silva Timossi^b, Ana Claudia Vecchi Osiecki^b, Raul Osiecki^b and Lupe Furtado Alle^a

^a*Polymorphism and Linkage Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil*

^b*Department of Physical Education, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil*

ABSTRACT

In this study, we investigated the influence of two SNPs (rs846910 and rs12086634) of the HSD11B1 gene that encodes 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11-HSD1), the enzyme that catalyzes the conversion of cortisol to cortisone, on variables associated with obesity and metabolic syndrome in 215 individuals of both sexes from southern Brazil. The HSD11B1 gene variants were genotyped using the TaqMan SNP genotyping assay. Glucose, triglycerides, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol were measured by standard automated methods. Significant results were found in women, with carriers of the G allele of SNP rs12086634 having higher glucose levels than non-carriers. Carriers of the A allele of SNP rs846910 had higher levels of HDL-cholesterol. The involvement of both polymorphisms as independent factors in determining the levels of glucose and HDL-cholesterol was confirmed by multiple regression analysis ($\beta = 0.19 \pm 0.09$, $p = 0.03$ and $\beta = 0.22 \pm 0.10$, $p = 0.03$, respectively). Our findings suggest that the HSD11B1 SNPs studied may indirectly influence glucose

and HDL-cholesterol metabolism in women, possibly through down-regulation of the HSD11B1 gene by estrogen.

Keywords: HSD11B1 gene, men, metabolism, metabolic syndrome, women.

Received: February 14, 2014; Accepted: May 12, 2014.

INTRODUCTION

The *HSD11B1* gene located at 1q32.2 (Tannin *et al.*, 1991) encodes the microsomal enzyme 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1) that is responsible for the conversion of the hormone cortisol (also known as stress hormone) to its metabolically inactive form cortisone (Ricketts *et al.*, 1998). An imbalance in the levels of cortisol is associated with visceral fat, insulin resistance and hyperlipidemia, all of which are related to obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and metabolic syndrome (Paterson *et al.*, 2004).

Various studies have suggested an important functional role of 11 β -HSD1 in the metabolic processes underlying these pathologies. In knockout animals, the absence of 11 β -HSD1 had a protective effect against insulin resistance and hyperglycemia because of the lack of glucocorticoid regeneration in the liver and adipose tissue (Kotelevtsev *et al.*, 1997; Morgan and Tomlinson, 2010). The reverse situation was seen in transgenic animals with over-expression of 11 β -HSD1, with an increase in the concentration of intra-adipocyte glucocorticoid, hyperglycemia and a marked central obesity phenotype (Masuzaki *et al.*, 2001). In particular, the G allele of SNP rs12086634 was associated with lower 11 β -HSD1 transcription *in vitro* (Draper *et al.*, 2003).

The association between the rs846910 polymorphism in the P2 promoter region and rs12086634 in an enhancer of the *HSD11B1* gene has been investigated in several clinical contexts (Gambineri *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2011; Utriainen *et al.*, 2012). In Pima Indians, these two SNPs were associated with T2DM, but not with obesity (Nair *et al.*, 2004). Gambineri *et al.* (2011) found that the combination of these SNPs in Caucasian women of northern Italy was associated with a higher risk of metabolic syndrome, regardless of the diagnosis of

polycystic ovary syndrome. In other studies, both SNPs were associated with T2DM and/or hypertension (Freedman *et al.*, 2001; Goff *et al.*, 2005).

Considering the wide range of biochemical and physiological effects of cortisol, it is possible that temporal or tissue-specific changes in the levels of this hormone could influence a wide range of complex diseases, including obesity and metabolic syndrome. Since the occurrence of genetic polymorphisms in the *HSD11B1* gene could influence cortisol levels, in this study we investigated the influence of two SNPs of the *HSD11B1* gene (rs846910 and rs12086634) on anthropometric and biochemical variables associated with obesity and metabolic syndrome in an adult population from southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The sample consisted of 215 workers of Euro-Brazilian descent employed by the Federal University of Paraná in southern Brazil. Since the aim in selecting the volunteers was to obtain a sample representative of the population heterogeneity, no pathology was used as an inclusion or exclusion criterion.

One hundred and forty-seven women (22-72 years old, 56% overweight and obese) and 68 men (23-60 years old, 23% overweight and obese) participated in the study. Assessment of the physical activity of the volunteers for seven days using a pedometer (Yamax Digi-Walker SW-700) showed that 23% were sedentary, 37% had low physical activity, 26% were active and 14% had high physical activity [according to criteria proposed by Wyatt *et al.* (2005) and Tudor-Locke *et al.* (2011)].

Individuals were considered obese when the body mass index (BMI) was ≥ 30 kg/m² and non-obese when the BMI was < 30 kg/m². Weight and height were measured with an accuracy of 0.1 kg and 0.1 cm, respectively. Glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC) and HDL-cholesterol (HDL-C) were measured by standard automated methods. LDL-cholesterol (LDL-C) levels were

calculated using the Friedewald equation (Friedewald *et al.*, 1972). The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná.

DNA analysis

DNA was extracted from peripheral blood by a salting-out method (Lahiri and Nurnberger Jr, 1991) and then diluted to a final concentration of 20 ng/μL. The variant located in the P2 promoter 5'URR (rs846910; SNP1; G/A) and the variant in the enhancer region of intron 3 (rs12086634; SNP2; T/G) were genotyped with a TaqMan SNP genotyping assay (Applied Biosystems). The reactions were done in a Mastercycler Realplex 2 (Eppendorf) using the following conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 50 cycles of 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min. Three previously sequenced control samples, representative of each of the possible genotypes, were included in each reaction for both SNPs.

Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm SEM. Frequency distributions, variances, the Shapiro-Wilk normality test, Student's *t*-test and the Mann-Whitney test were calculated using Statistica for Windows v. 5.0 (StatSoft Inc. 1996, Tulsa, Oklahoma). Chi-square tests were done using Clump (Sham and Curtis, 1995). Multiple regression analyses were done using SPSS for Windows v. 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Table 1 shows the allele frequencies of the two SNPs in the sample stratified by sex and BMI. The genotype frequencies in the overall sample and in the groups were in Hardy-Weinberg equilibrium.

Table1 - Allele frequencies (%) of SNPs 1 and 2 of the *HSD11B1* gene in samples stratified by sex (men and women) and BMI (obese and non-obese).

SNP	Men		Women	
	Obese (n= 16)	Non-obese (n=52)	Obese (n=38)	Non-obese (n=109)
SNP1: rs846910				
Allele A	6.1 ± 4	11.0 ± 3	6.9 ± 2	8.5 ± 1
Allele G	93.8 ± 4	89.0 ± 3	93.0 ± 2	91.5 ± 1
SNP2: rs 12086634				
Allele G	15.6 ± 6	20.1 ± 3	18.4 ± 4	22.9 ± 2
Allele T	84.4 ± 6	79.8 ± 3	81.6 ± 4	77.1 ± 2

The results are expressed as the mean % ± SEM. Obese individuals: BMI ≥ 30 kg/m²; non-obese individuals: BMI <30 kg/m²

There was no difference in allele frequency between obese and non-obese men ($\chi^2 = 0.62$, $p = 0.43$), nor between obese and non-obese women ($\chi^2 = 0.17$, $p = 0.67$) for SNP1. A similar result was found in comparisons between obese and non-obese men and women for SNP2 allele frequencies ($\chi^2 = 0.33$, $p = 0.56$ and $\chi^2 = 0.67$, $p = 0.41$, respectively).

Analyses performed with the stratification of the sample only by gender, showed that there was no significant difference in the BMI of men and women (26.87 ± 4.00 and 27.20 ± 5.44 , respectively; $p=0.97$). However, there were significant differences in the HDL-C, TG and glucose levels of men and women, regardless of the *HSD11B1* genotype ($p = 0.00001$, $p = 0.001$ and $p = 0.006$, respectively) (Figure 1).

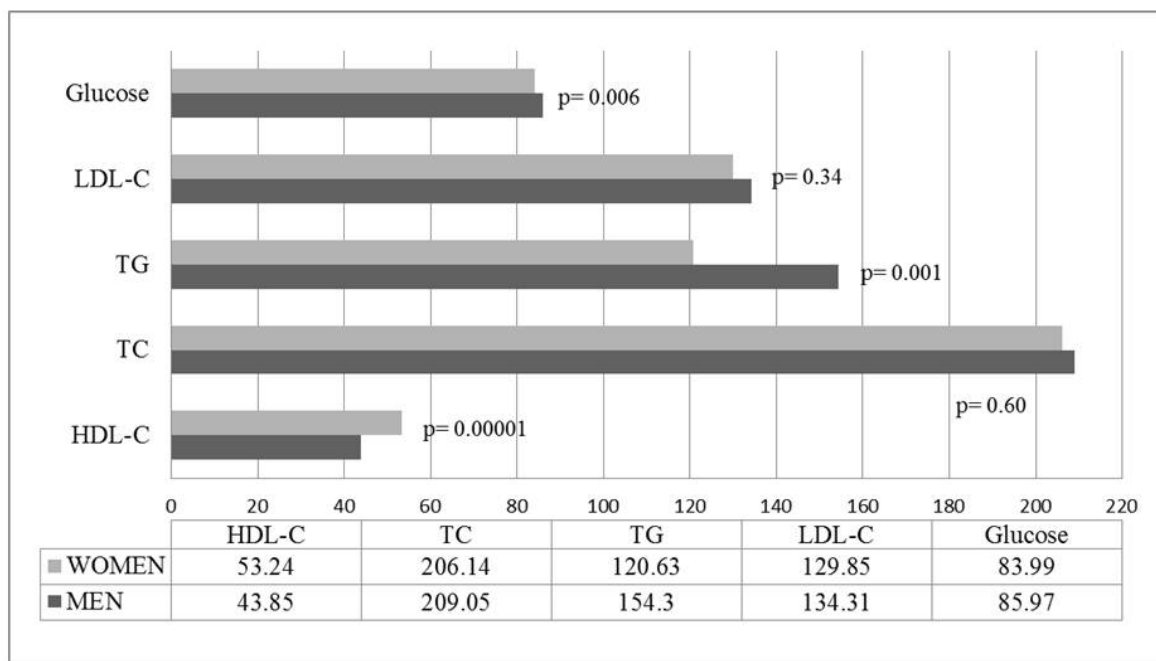


Figure 1 - HDL-C, TC, TG, LDL-C and glucose levels in men and women. The columns represent the mean of 68 men and 147 women. All values are expressed in mg/dl. Statistical comparisons were done using Student's *t*-test.

Combination analysis with the two SNPs (rs846910 and rs12086634) revealed no significant associations, in contrast to the findings of Gambineri *et al.* (2011). However, when the effects of each of the two *HSD11B1* SNPs on the biochemical variables and BMI were analyzed separately in men and women, significant differences were found only in women (Table 2). Carriers of the A allele (rare) of SNP1 had significantly higher HDL levels when compared to individuals homozygous for the G allele (common). Similarly, carriers of the G allele (rare) of SNP2 had higher glucose levels (tending to significance, $p = 0.06$) compared to women homozygous for the T allele (common).

Table 2 - Comparison of the BMI, HDL-C, TC, TG, LDL-C and glucose levels in men and women stratified as carriers of common (G or T) or rare (A or G) alleles of SNPs 1 and 2.

SNP	Men			Women		
SNP1: rs846910	A allele carriers (n=13)	Non-carriers (n=55)	p	A allele carriers (n=21)	Non-carriers (n=126)	p
BMI (kg/m ²)	26.21 ± 3.76	27.05 ± 4.22	0.51	26.57 ± 4.85	27.20 ± 5.42	0.61
HDL (mg/dl)	45.83 ± 9.06	43.22 ± 9.13	0.37	59.65 ± 16.29	50.94 ± 14.74	0.03
TC (mg/dl)	215.83 ± 23.72	209.42 ± 36.91	0.56	202.40 ± 53.49	205.77 ± 35.34	0.71
TG (mg/dl)	156.91 ± 45.14	156.83 ± 86.99	0.51	124.40 ± 70.08	117.85 ± 60.68	0.83
LDL (mg/dl)	139.41 ± 21.69	132.14 ± 37.48	0.52	123.58 ± 39.59	130.18 ± 29.99	0.39
Glucose (mg/dl)	86.91 ± 7.25	86.07 ± 9.72	0.60	88.95 ± 40.88	80.97 ± 18.73	0.33

	Men			Women		
SNP2: rs12086634	G allele carriers (n=24)	Non-carriers (n=44)	p	G allele carriers (n=58)	Non-carriers (n=89)	p
BMI (kg/m ²)	26.04 ± 3.90	27.33 ± 4.11	0.20	27.44 ± 5.30	27.05 ± 5.53	0.67
HDL (mg/dl)	44.27 ± 7.85	43.71 ± 9.62	0.81	51.43 ± 14.23	54.34 ± 13.34	0.23
TC (mg/dl)	206.50 ± 25.73	209.20 ± 38.72	0.76	202.07 ± 39.60	208.61 ± 38.27	0.34
TG (mg/dl)	138.81 ± 61.08	157.60 ± 78.82	0.33	116.92 ± 51.93	122.89 ± 64.22	0.92
LDL (mg/dl)	134.90 ± 22.75	133.90 ± 34.90	0.90	129.68 ± 29.77	129.95 ± 33.27	0.77
Glucose (mg/dl)	84.72 ± 7.56	86.64 ± 9.84	0.42	85.39 ± 16.20	83.14 ± 21.47	0.06

The data are expressed as the mean ± SEM of the number of individuals indicated in parentheses. Statistical comparisons between men and women (stratified by genotype) were done using Student's *t*-test (*t*) for parametric data and the Mann-Whitney test (*Z*) for non-parametric data. Significant differences (*p* values) are indicated in bold.

Multiple regression analysis was used to confirm the effect of these genetic variants on HDL and glucose levels (Table 3). When HDL-C was used as the dependent variable and SNP1, age and BMI as the independent variables, the analyses showed that BMI and SNP1 were independent factors in determining the HDL-C levels in women ($\beta = -0.37 \pm 0.11$, $p = 0.002$ and $\beta = 0.22 \pm 0.10$, $p = 0.03$, respectively). Similar results were obtained when glucose was used as the dependent variable and age, BMI and SNP2 were the dependent variables, i.e., BMI and SNP2 were independent factors for increasing glucose levels ($\beta = 0.46 \pm 0.10$, $p = 0.00002$ and $\beta = 0.19 \pm 0.09$, $p = 0.03$, respectively).

Table 3 - Results of the multiple regression analysis.

Dependent variable	Independent variable considered	Independent variable confirmed	$\beta \pm \text{SEM}$	p
HDL-C levels	SNP1, age and BMI	BMI and SNP1	(-0.37 ± 0.11) and (0.22 ± 0.10) , respectively	0.002 and 0.03, respectively
Glucose levels	SNP2, age and BMI	BMI and SNP2	(0.46 ± 0.10) and (0.19 ± 0.09) , respectively	0.00002 and 0.03, respectively

DISCUSSION

The importance of gender differences in molecular biology is being increasingly recognized. Cellular responses to stress, even before exposure to sex hormones, are different in men and women (Du *et al.*, 2004) and probably reflect gender-related differences in metabolic pathways (Pollitzer, 2013). Indeed, the higher prevalence of obesity and diabetes in women compared to men, especially after the onset of menopause (Ryan, 2009), indicates that gender-related metabolic differences can influence the mechanisms of these diseases. The greater amount of visceral fat and higher fat content in the liver correlate with the lack of a protective effect of estrogen in premenopausal women (Geer and Shen, 2009). However, the effect of estrogen on the metabolism of adipose tissue is not fully understood. Premenopausal women have a higher density of antilipolytic α_2 -adrenergic receptors than men (Richelsen, 1986). Pedersen *et al.* (2004) demonstrated that estradiol increases the expression of this receptor in human adipocytes through activation of ER- α receptors only in subcutaneous adipose tissue, with no effect on visceral adipose tissue. Estradiol thus favors the deposition of subcutaneous fat at the expense of visceral deposition. The activity of LPL (lipoprotein lipase), which controls fat uptake in adipocytes, is also influenced by estradiol since this hormone has transcriptional inhibitory effects (Homma *et al.*, 2000) and decreases the transcription and enzymatic activity of 11 β -HSD1 in rodents (New *et al.*, 2000). Postmenopausal women with normal weight show enhanced 11 β -HSD1 activity in adipose tissue and liver (Andersson *et al.*, 2009), suggesting that low estrogen levels may up-regulate 11 β -HSD1 activity and

contribute to the imbalance of energy metabolism influenced by cortisol. In a study of inflammatory bowel disease, 11 β -HSD1 expression was higher in male than in female patients, whereas 11 β -HSD2 showed not gender-specific regulation in its expression (Stegk *et al.*, 2009).

As shown here, only in women was the presence of the rare SNP2 allele associated with higher glucose levels, whereas women homozygous for the common SNP1 allele showed lower HDL-C levels compared to rare allele carriers. The combination of higher glucose levels and lower HDL-C levels may have an important role in the development of pathologies associated with obesity. Lower than normal levels of HDL-C have been related to the early development of T2DM (Von Eckardstein *et al.*, 2000), and conditions such as insulin resistance and obesity may also be related to lower HDL-C levels and to the generation of small particles of HDL-C that can result in several functional changes (Goff *et al.*, 2005).

Men and woman show different responses to the same food intake. Compared to women, men have higher levels of postprandial insulin and TG (Cohn *et al.*, 1988), suggesting that estrogen also has a beneficial effect on TG levels in response to food ingestion (Westerveld, 1998). The sexual dimorphism in TG levels was striking in our study: women had a normal mean TG level, whereas men had a borderline mean TG level, based on age- and gender-related reference values for TG.

Since the women in this study were more sensitive to the effects of the *HSD11B1* gene polymorphisms investigated here, it is possible that such variations influence the modulation established between estrogen and 11 β -HSD1. The presence of the two SNPs may alter the down-regulation caused by estrogen and possibly lead to an imbalance in the metabolic pathways involved in glucose and fat metabolism.

Divergent results have been reported for the effect of these variants on *HSD11B1* expression. The G allele of SNP rs12086634 was associated with lower transcriptional activity *in vitro* (Draper *et al.*, 2003), whereas the less frequent allele combination (A and G) for these two SNPs (rs846910 and rs12086634, respectively) was associated with higher mRNA levels and 11 β -HSD1 activity in

adipose tissue in southern European Caucasian women with and without polycystic ovary syndrome (PCOS) (Gambineri *et al.*, 2011). Other studies found no relationship between one or both variants and 11 β -HSD1 levels (Nair *et al.*, 2004; Millan *et al.*, 2005; White, 2005; Malavasi *et al.*, 2010). The genetic variants investigated here may have increased the *HSD11B1* transcriptional levels, leading to an imbalance of homeostasis via estradiol down-regulation in women. A similar effect was not detected in males, suggesting that mechanisms other than estradiol suppress the influence of these genetic polymorphisms on the metabolic variables investigated in this study.

Such polymorphisms may represent only a minor contribution to the mechanisms underlying this imbalance. Our results showed that the SNPs and BMI had an independent effect on glucose and HDL-C levels in women, although other factors need to be considered. Other variables such as smoking (Brischetto *et al.*, 1983), abdominal fat distribution (Ostlund *et al.*, 1990) and aerobic exercise training (Kokkinos and Fernhall, 1999) have also been related to HDL-C levels. Moreover, a decline in HDL-C levels simultaneous to the decline in estrogen levels in post-menopausal woman has been described (Li *et al.*, 1996; Senoz *et al.*, 1996; Pasquali *et al.*, 1997); insulin and glucose levels have also been related to HDL-C, which suggests an influence of carbohydrate metabolism and sex hormone status on the levels of this lipoprotein (Sowers and Sigler, 1999).

Among the limitations of this study was the sample size, which may not have been large enough to detect any other significant results. In addition, a functional relationship between the variants studied would be better established in a case-control study, especially with postmenopausal women.

In conclusion, we found that the SNPs investigated here acted as independent factors in determining glucose and HDL-C levels only in women. This finding suggested a potentially important sexually dimorphic effect that may be related to gene regulation exerted by estrogen.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES and Fundação Araucaria.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Andersson T, Simonyte K, Andrew R, Strand M, Burén J, Walker BR, Mattson C and Olsson T (2009) Tissue-specific increases in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in normal weight postmenopausal women. *PLoS One* 4:1-8.
- Brischetto CS, Connor WE, Connor SL and Matarazzo JD (1983) Plasma lipid and lipoprotein profiles of cigarette smokers from randomly selected families: enhancement of hyperlipidemia and depression of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol* 52:675-680.
- Cohn JS, McNamara JR, Cohn SD, Ordovas JM and Schaefer EJ (1988) Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *Lipid Res* 29:469-479.
- Draper N, Walker EA, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Chalder SM, Arlt W, Lavery GG, Bedendo O, Ray DW, Laing I, *et al.* (2003) Mutations in the genes encoding 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. *Nat Genet* 34:434-439.
- Du L, Bayir H, Lai Y, Zhang X, Kochanek PM, Watkins SC, Graham SH and Clark RS (2004) Innate gender-based proclivity in response to cytotoxicity and programmed cell death pathway. *J Biol Chem* 279:38563-38570.
- Freedman DS, Bowman BA, Srinivasan SR, Berenson GS and Otvos JD (2001) Distribution and correlates of high-density lipoprotein subclasses among children and adolescents. *Metabolism* 50:370-376.
- Friedewald WT, Levy RI and Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18:499-502.
- Gambineri A, Tomassoni F, Munarini A, Stimson RH, Mioni R, Pagotto U, Chapman KE, Andrew R, Mantovani V, Pasquali R, *et al.* (2011) A combination

- of polymorphisms in HSD11B1 associates with *in vivo* 11 β -HSD1 activity and metabolic syndrome in women with and without polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol* 165:283-292.
- Geer EB and Shen W (2009) Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med* 6:60-75.
- Goff DC, D'Agostino Jr RB, Haffner Jr SM and Otvos JD (2005) Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the insulin resistance atherosclerosis study. *Metabolism* 54:264-270.
- Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y and Murata Y (2000) Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem* 275:11404-11411.
- Kokkinos PF and Fernhall B (1999) Physical activity and high density lipoprotein cholesterol levels: what is the relationship? *Sports Med* 28:307-314.
- Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, *et al.* (1997) 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14924-14929.
- Lahiri DK and Nurnberger Jr JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Li Z, McNamara JR, Fruchart JC, Luc G, Bard JM, Ordovas JM, Wilson PW and Schaefer EJ (1996) Effects of gender and menopausal status on plasma lipoprotein subspecies and particle sizes. *J Lipid Res* 37:1886-1889.
- Malavasi ELV, Kelly V, Nath N, Gambineri A, Dakin RS, Pagotto U, Pasquali R, Walker BR and Chapman KE (2010) Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11-HSD1 alters enzyme levels. *Endocrinology* 151:195-202.

- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR and Flier JS (2001) A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294:2166–2170.
- Millan JL, Botella-Carratero JI, Alvarez-Blasco F, Luque-Ramirez M, Sancho J, Moghetti P and Escobar-Morreale HF (2005) A study of the hexose-6-phosphate dehydrogenase gene R453Q and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene 83557insA polymorphisms in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4157-4162.
- Moon SS, Lee YS, Kim JG, Kim SW, Jeong JY, Jeon EJ, Seo HA, Kwak SH, Park KS and Lee IK (2011) Relationship of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Endocr J* 58:949-959.
- Morgan SA and Tomlinson JW (2010) 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 19:1067-1076.
- Nair S, Lee YH, Lindsay RS, Walker BR, Tataranni PA, Bogardus C, Baier LJ and Permana PA (2004) 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: genetic polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. *Diabetologia* 47:1088-1095.
- New KH, Hamid A, Morat PB and Khalid BA (2000) Differential regulation of the oxidative 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in testis and liver. *Steroids* 65:40-45.
- Ostlund RE, Staten M, Kohrt WM, Schult J and Malley M (1990) The ratio of waist-to-hip circumference, plasma insulin level, and glucose intolerance as independent predictors of the HDL2 cholesterol level in older adults. *N Engl J Med* 322:229-234.
- Pasquali R, Casimirri F, Pascal G, Tortelli O, Morselli Labate A, Bertazzo D, Vicennati V and Gaddi A (1997) Influence of menopause on blood cholesterol levels in women: the role of body composition, fat distribution, and hormonal milieu. *J Intern Med* 24:195-203.

- Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, Seckl JR and Mullins JJ (2004) Metabolic syndrome without obesity: hepatic overexpression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7088-7093.
- Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA and Richelsen B (2004) Estrogen controls lipolysis by up-regulating α_{2A} -adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor α . Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1869-1878.
- Pollitzer E (2013) Cell sex matters. *Nature* 500:23-24.
- Richelsen B (1986) Increased α_2 - but similar β -adrenergic receptor activities in subcutaneous gluteal adipocytes from females compared with males. *Eur J Clin Invest* 16:302-309.
- Ricketts ML, Verhaeg JM, Bujalska I, Howie AJ, Rainey WE and Stewart PM (1998) Immunohistochemical localization of type 1 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1325-1335.
- Ryan JG (2009) Cost and policy implications from the increasing prevalence of obesity and diabetes mellitus. *Gend Med* 6:86-108.
- Senoz S, Direm B, Gulecki B and Gokmen O (1996) Estrogen deprivation, rather than age, is responsible for the poor lipid profile and carbohydrate metabolism in women. *Maturitas* 25:107-114.
- Sham PC and Curtis D (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet* 59:97-105.
- Sowers MF and Sigler C (1999) Complex relation between increasing fat mass and decreasing high density lipoprotein cholesterol levels: evidence from a population-based study of premenopausal women. *Am J Epidemiol* 149:47-54.
- Stegk JP, Ebert B, Martin H-J and Maser E (2009) Expression profiles of human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases type 1 and type 2 in inflammatory bowel diseases. *Mol Cell Endocrinol* 301:104-108.
- Tannin GM, Agarwal AK, Monder C, New MI and White PC (1991) The human gene for 11- β -hydroxysteroid dehydrogenase: structure, tissue distribution, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 266:16653-16658.

- Tudor-Locke C, Craig CL, Brown WJ, Clemes AS, De Cocker K, Giles-Corti B, Hatano Y, Inoue S, Matsudo SM, Mutrie N, *et al.* (2011) How many steps/day are enough for adults? *Int J Behav Nutr Phys Act* 8:79.
- Utriainen P, Laakso S, Jääskeläinen J and Voutilainen R (2012) Polymorphisms of POR, SULT2A1 and HSD11B1 in children with premature adrenarche. *Metabolism* 61:1215-1219.
- Von Eckardstein A, Schulte H and Assmann G (2000) Risk for diabetes mellitus in middle-aged Caucasian male participants of the PROCAM study: implications for the definition of impaired fasting glucose by the American Diabetes Association. *Prospective Cardiovascular Munster. J Clin Endocrinol Metab* 85:3101-3108.
- Westerveld HE (1998) Estrogens and postprandial lipid metabolism. *Atherosclerosis* 141:105-107.
- White PC (2005) Genotypes at 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 11B1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase loci are not risk factors for apparent cortisone reductase deficiency in a large population-based sample. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5880-5883.
- Wyatt HR, Peters JC, Reed GW, Barry M and Hill JO (2005) A Colorado statewide survey of walking and its relation to excessive weight. *Med Sci Sports Exerc* 37:724-730.

CAPÍTULO II

***ADIPOQ* single nucleotide polymorphism: Independent association with adiponectin and lipoproteins levels restricted to men.**

Luciane Viater Turek^a, Neiva Leite^b, Ricardo Lehtonen Rodrigues Souza^a, Luciana da Silva Timossi^b, Ana Claudia Vecchi Osiecki^b, Raul Osiecki^b and Lupe Furtado Alle^a

^a*Polymorphism and Linkage Laboratory, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil*

^b*Department of Physical Education, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil*

Abstract

Adiponectin is an adipokine inversely correlated with obesity, which has beneficial effect on insulin resistance and lipid metabolism. Considering its potential as a therapeutic target in the metabolic disorders contexts, and in order to add knowledge in the area, our study evaluated the *ADIPOQ* 276G>T polymorphism effect on adiponectin levels, and on lipoproteins of clinical interest in a population sample composed of 211 healthy individuals. Significant effects were observed only among men: the carriers of heterozygous genotype (GT) showed high levels of adiponectin ($p = 0.018$), while the rare homozygous genotype (TT) gave its carriers a negative phenotype, represented by higher levels of LDL-C ($p = 0.001$ and $p = 0.000$) and TC ($p = 0.002$ and $p = 0.001$) compared to carriers of other genotypes (GG and GT respectively). The independent effect of SNP on LDL-C and TC levels was confirmed by multiple regression analysis ($p = 0.008$ and $p = 0.044$). We found no evidence of correlation between circulating adiponectin levels and biochemical markers, which suggests, therefore, an SNP 276G>T independent effect on adiponectin levels and on lipoprotein metabolism in men enrolled in this study.

Abbreviations:

Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK); Body mass index (BMI); Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA); Genome-wide association study (GWA study); hepatic lipase (HL); high density lipoprotein cholesterol (HDL-C); intermediate density lipoproteins (IDL); lipoprotein lipase (LPL); low density lipoprotein (LDL-C); LDL-C receptor (LDLR); single-nucleotide polymorphism (SNP); total cholesterol (TC); triglycerides (TG); very low density lipoproteins (VLDL).

INTRODUCTION

Adipose tissue, besides the traditional functions of energy storage and thermal insulator, is considered as an endocrine organ (Kershaw & Flier 2004), able of acting in multiple metabolic pathways, due large amounts of bioactive compounds that are secreted by it, including free fatty acids and various adipokines, such as adiponectin (Whitehead *et al.* 2006, Lara-Castro *et al.* 2007).

Adiponectin is exclusively secreted by adipose tissue, being inversely correlated with obesity (Arita *et al.* 1999). Systemic action of adiponectin has been demonstrated, contributing for the glucose and lipid metabolism modulation, (Cnop *et al.* 2003, Zhao & Zhao 2011), with anti-inflammatory and antiatherogenic properties (Kubota *et al.* 2002, Nawrocki & Scherer 2004). It acts through activation of several intracellular pathways, including the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) pathway, promoting the free fatty acids oxidation and increasing glucose uptake by reducing gluconeogenesis in the liver, (Fruebis *et al.* 2001). These actions are associated with improvement of insulin resistance markers (Hotta *et al.* 2000, Weyer *et al.* 2014), increasing of nitric oxide production (Chen *et al.* 2003, Qiao *et al.* 2008), and suppression of endothelial expression of adhesion molecules, smooth muscle cells proliferation, and the transformation of macrophages into foam cells (Ouchi *et al.* 1999).

The variants of adiponectin gene (*ADIPOQ*; 3q27.3) were associated with obesity, metabolic syndrome markers and cardiovascular disease (Gao *et al.* 2013,

Cheung *et al.* 2014, Lu *et al.* 2014). Given the complex network of adiponectin interactions with several enzymes and hormones, and a wide range of modulator factors, the study's results which evaluate the *ADIPOQ* SNPs effects on metabolism homeostasis are quite diverse (Zhao & Zhao 2011, Gao *et al.* 2013), but very promising (Cheung *et al.* 2014, Lu *et al.* 2014), revealing that some variants seem to play a relevant role in these contexts.

Considering the adiponectin functional role in the metabolic processes of various clinical contexts, and its possibility to become a therapeutic target (Caselli 2014, Hand *et al.* 2015), our work aims to contribute to knowledge in the area by evaluating the variant 276G>T (rs1501299) effect on adiponectin levels, and on biochemical markers associated with metabolic syndrome and cardiovascular risk in a population sample from Southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The sample consisted of 211 workers of Euro-Brazilian descent employed by the Federal University of Paraná in Southern Brazil. Since the aim in selecting the volunteers was to obtain a sample representative of the population heterogeneity, no pathology was used as an inclusion or exclusion criterion.

One hundred and thirty-seven women (24-70 years old, 60.9% overweight and obese) and seventy-four men (26-59 years old, 66.6% overweight and obese) participated in the study. Weight and height were measured with an accuracy of 0.1 kg and 0.1 cm respectively, (BMI \geq 25 =overweight; BMI \geq 30=obese).

Assessment of the physical activity of the volunteers for seven days using a pedometer (YamaxDigi-Walker SW-700) showed that 23% were sedentary, 37% had low physical activity, 26% were active and 14% had high physical activity [according to criteria proposed by (Wyatt *et al.* 2005) and (Tudor-Locke *et al.* 2011)].

The sample used for independently test our results consisted of 182 premenopausal women from a different sample of a Southern Brazilian population.

The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná (CEP/SD 1159.084.11.06/ CAAE0082.0.091.000-11).

Biochemical parameters

Glucose, triglycerides (TG), total cholesterol (TC), HDL-cholesterol (HDL-C) and LDL-cholesterol (LDL-C) levels were measured by standard automated methods.

The adiponectin concentration was measured in 128 individuals by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method according to manufacturer's protocol (kit Elisa Duo Set Human Adiponectin, R&D systems).

DNA analysis

DNA was extracted from peripheral blood by a salting-out method (Lahiri & Nurnberger Jr 1991) and then diluted to a final concentration of 20 ng/μL. The intronic variant rs1501299 (276G>T) of *ADIPOQ* gene, were genotyped using a TaqMan allelic discrimination assay on an StepOnePlus™ real time PCR systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The conditions of TaqMan reactions were as follows: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min and 50 cycles of 95 °C for 15 s and 62 °C for 1 min. Three previously sequenced control samples, representative of each of the possible genotypes, were included in each reaction.

Statistical analysis

Allele and genotype frequencies of the SNP genotyped were obtained by direct counting and Hardy-Weinberg equilibrium was tested with χ^2 test.

Kolmogorov-Smirnov with Lilliefors correction test was used to evaluate the normality of the variables distribution. The comparisons between means were performed by t-test (parametric variables) or by Mann-Whitney test (for non-parametric and independent variables), and within-group and between-group differences were analyzed using Kruskal-Wallis.

A multiple regression analysis was performed to confirm the hypothesis that the variables are independent factors for observed differences. Spearman rank

order correlations analysis, for non-parametric correlation, was applied to test correlations between variables.

The probability value for the comparative tests were considered significant at $p < 0.05$ (5%).

RESULTS

The genotype distribution of the investigated SNP is in Hardy-Weinberg equilibrium, and allele and genotype frequencies are shown in Table 1.

TABLE 1: Allele and genotype frequencies of 276G>T SNP (% \pm standard error) in the total sample (n=211)

Allele frequencies			Genotype frequencies	
G	69.9	± 0.01	GG	48.34
T	30.1	± 0.01	TG	43.13
			TT	8.53

The Kruskal-Wallis test results revealed differences in the levels of some biochemical variables: HDL-C, LDL-C and TC ($p = 0.0379$; $p = 0.0133$ and $p = 0.0097$ respectively) when compared carriers of the three possible SNP 276G> T genotypes (GG, GT, TT) of the *ADIPOQ* gene.

In order to identify where these differences lie, the three possible SNP 276G>T genotypes were compared two by two (Table 2). The tests results showed that homozygotes for the less frequent allele had significantly higher means of LDL-C and TC compared with heterozygotes ($p = 0.03$ and $p = 0.004$, respectively), and also when compared with common homozygotes ($p = 0.01$ and $p = 0.02$, respectively). No significant differences were observed in adiponectin levels among carriers of the three possible genotypes in the total sample ($p > 0.5$) (Table 2).

Table 2: Means (\pm SE) of insulin, glucose, HDL-C, LDL-C, TG, TC and adiponectin, and paired comparisons (p) among carriers of the three possible 276G>T SNP genotypes.

Biochemical parameters	SNP 276G>T Genotypes			Comparisons	p
	GG ^A (n=102)	GT ^B (n=91)	TT ^C (n=18)		
Insulin (μ UI/mL)	10.71 \pm 10.32	9.15 \pm 4.64	8.00 \pm 3.87	AXB	0.595
				BXC	0.626
				AXC	0.380
Glucose (mg/dl)	84.58 \pm 13.15	85.30 \pm 20.88	82.16 \pm 8.38	AXB	0.813
				BXC	0.627
				AXC	0.854
HDL-C (mg/dl)	50.56 \pm 13.48	48.99 \pm 12.77	52.22 \pm 11.58	AXB	0.435
				BXC	0.160
				AXC	0.431
LDL-C (mg/dl)	131.26 \pm 31.48	126.83 \pm 28.66	151.99 \pm 41.12	AXB	0.310
				BXC	0.031
				AXC	0.016
TG (mg/dl)	133.92 \pm 65.15	126.34 \pm 65.25	142.67 \pm 88.30	AXB	0.288
				BXC	0.468
				AXC	0.895
TC (mg/dl)	208.59 \pm 34.71	199.64 \pm 37.90	228.88 \pm 42.79	AXB	0.088
				BXC	0.004
				AXC	0.029
Adiponectin (ng/mL)	GG (n=69)	GT (n=48)	TT (n=11)		p
				AXB	0.583
	4.35 \pm 1.86	4.69 \pm 2.36	3.97 \pm 1.84	BXC	0.436
				AXC	0.650

Note: A corresponds to the GG genotype; B to GT genotype and C to TT genotype.

Considering the variations in metabolic processes which are inherent to gender, we conducted the same analyses in the sample stratified by gender. We observed that the differences in LDL-C and TC mean levels remained only in men, and between the same genotypes: homozygotes for the less frequent allele had higher mean levels compared with heterozygotes ($p=0.0003$ and $p=0.0009$

respectively) and common homozygotes ($p=0.0008$ and $p=0.001$ respectively). The adiponectin mean levels are higher in heterozygotes compared with common homozygotes ($p = 0.018$) only in men (Table 3). When we analyze the genotypes together, differences in adiponectin, TC and LDL levels remained, as shown in Table 4.

Table 3: Biochemical variables means (\pm SE) in men and women, stratified by 276G>TSNP genotypes and compared two by two (p).

Biochemical parameters	Men					Women				
	GG ^A (n=33)	GT ^B (n=35)	TT ^C (n=6)	Comparisons	p	GG ^A (n=69)	GT ^B (n=55)	TT (n=12) ^C	Comparisons	p
Insulin (μUI/MI)	8.93±5.40	9.60±4.49	10.04±4.18	AXB	0.477	11.50±11.85	9.10±4.77	6.31±2.90	AXB	0.351
				BXC	0.874				BXC	0.207
				AXC	0.558				AXC	0.075
Glucose (mg/dl)	84.94±11.34	86.71±7.05	88.33±5.28	AXB	0.095	84.40±14.00	84.65±26.27	79.08±8.05	AXB	0.332
				BXC	0.897				BXC	0.578
				AXC	0.192				AXC	0.279
HDL-C (mg/dl)	44.91±10.33	42.88±6.62	46.83±11.18	AXB	0.492	53.26±14.03	53.12±14.11	54.92±11.26	AXB	0.910
				BXC	0.568				BXC	0.578
				AXC	0.683				AXC	0.623
LDL-C (mg/dl)	131.46±28.29	131.22±25.70	181.73±45.12	AXB	0.970	131.16±33.09	124.71±30.17	137.12±31.06	AXB	0.264
				BXC	0.000				BXC	0.204
				AXC	0.001				AXC	0.563
TG (mg/dl)	147.64±72.18	150.09±77.65	188.83±118.31	AXB	0.801	127.36±60.97	112.45±57.63	119.58±62.78	AXB	0.143
				BXC	0.671				BXC	0.713
				AXC	0.360				AXC	0.632
TC (mg/dl)	205.97±30.87	204.17±30.64	256.00±45.46	AXB	0.810	209.84±36.55	197.89±41.41	215.33±35.90	AXB	0.091
				BXC	0.001				BXC	0.181
				AXC	0.002				AXC	0.631
	Men					Women				
	GG (n=21)	GT (n=11)	TT (n=5)	Comparisons	p	GG (n=48)	GT (n=37)	TT (n=6)	Comparisons	p
Adiponectin (ng/mL)	3.96±2.18	5.64±2.28	3.62±0.77	AXB	0.018	4.52±1.70	4.40±2.34	4.258798	AXB	0.364
				BXC	0.079				BXC	0.930
				AXC	0.696				AXC	0.804

Note: A corresponds to the GG genotype; B to GT genotype and C to TT genotype.

Table 4: Biochemical variables means (\pm SE) in men and women, stratified by 276G>TSNP grouped genotypes and compared two by two (p).

Biochemical parameters	Men						women					
	GG (n=33)	GT+TT (n=41)	p	GG + GT (n=68)	TT (n=6)	p	GG (n=69)	GT+TT (n=67)	p	GG + GT (n=124)	TT (n=12)	p
Insulin (μ UI/MI)	8.93 \pm 5.4	9.73 \pm 7.2	0.403	9.17 \pm 5.0	10.04 \pm 4.1	0.6348	11.50 \pm 11.8	8.71 \pm 4.6	0.176	10.45 \pm 9.4	6.31 \pm 2.9	0.106
Glucose (mg/dl)	84.93 \pm 11.3	86.95 \pm 6.7	0.065	85.85 \pm 9.3	88.33 \pm 5.2	0.4577	84.40 \pm 14.0	83.65 \pm 24.0	0.231	84.52 \pm 20.2	79.08 \pm 8.0	0.373
HDL-C (mg/dl)	44.9 \pm 10.3	43.46 \pm 7.4	0.625	43.87 \pm 8.6	46.83 \pm 11.1	0.5997	53.26 \pm 14.0	53.45 \pm 13.5	0.794	53.20 \pm 14.0	54.92 \pm 11.2	0.583
LDL-C (mg/dl)	131.46 \pm 28.2	138.6 \pm 33.8	0.335	131.33\pm26.7	181.73\pm45.1	0.0001	131.16 \pm 33.0	126.93 \pm 30.4	0.440	128.30 \pm 31.8	137.11 \pm 31.0	0.361
TG (mg/dl)	147.64 \pm 72.1	155.76 \pm 84.0	0.628	148.90 \pm 74.4	188.83 \pm 118.3	0.4821	127.36 \pm 60.9	113.73 \pm 58.1	0.154	120.75 \pm 59.7	119.58 \pm 62.7	0.921
TC (mg/dl)	205.97 \pm 30.8	211.76 \pm 37.4	0.478	205.04\pm30.5	256.00\pm45.4	0.0003	209.84 \pm 36.5	201.01 \pm 40.7	0.186	204.54 \pm 39.0	215.33 \pm 35.9	0.359
	Men						women					
	GG (n=21)	GT+TT (n=16)	p	GG + GT (n=32)	TT (n=5)	p	GG (n=48)	GT+TT (n=43)	p	GG + GT (n=85)	TT (n=6)	p
Adiponectin (ng/mL)	3.96\pm2.18	5.01\pm2.13	0.043	4.53 \pm 2.32	3.62 \pm 0.76	0.689	4.52 \pm 1.70	4.38 \pm 2.33	0.373	4.47 \pm 1.98	4.26 \pm 2.47	0.848

Multiple regression analysis tests were performed to confirm the observed effect of the SNP 276G>T genotypes (independent variables), age and BMI (continuous variables/covariates) on the LDL-C and TC levels (dependent variables), categorizing the samples by gender. The results showed that the SNP 276G>T genotype acted independently for the determination of LDL-C and TC levels in men ($F = 7.308$, $p = 0.008$; and $F = 4.1476$, $p = 0.044$ respectively) Figure 1 and 2.

The Spearman correlation analysis was performed to check the inter-relationship among adiponectin levels, 276G>T variant, LDL-C and TC levels in men. There was no significant correlation between the LDL-C and TC levels and adiponectin circulating levels ($\rho = -0.024$, $p > 0.05$; $\rho = -0.030$, $p > 0.05$, respectively), however the 276G>T variant was significantly correlated with adiponectin levels in men ($\rho = 0.428$, $p < 0.05$).

To validate our findings, the same tests were applied to an independent sample available in our database composed of 182 healthy women. The results also showed no association of *ADIPOQ* SNP 276G>T with any of the biochemical variables evaluated (supplementary material).

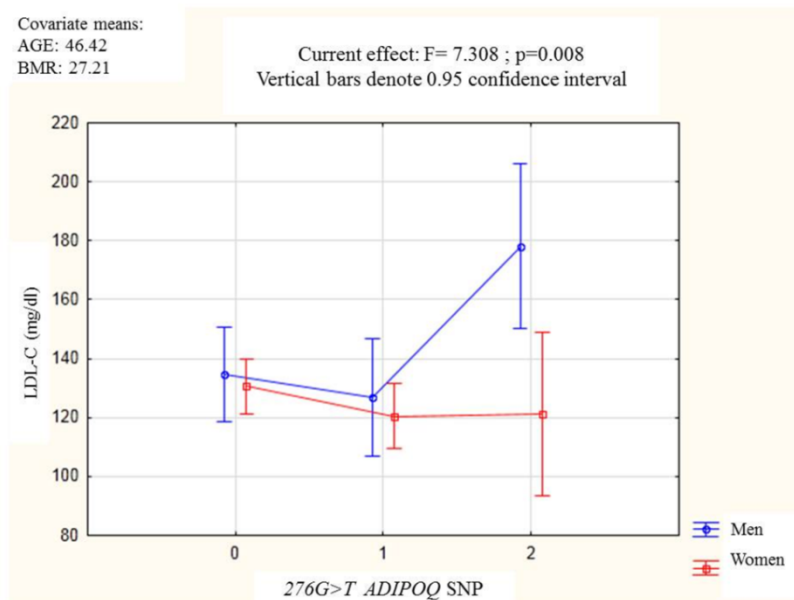


FIGURE 1: Multiple regression analysis, where the effect of the three possible 276G>T genotypes on LDL-C levels were evaluated in men and women. GG genotype (0); GT genotype (1), and TT genotype (2).

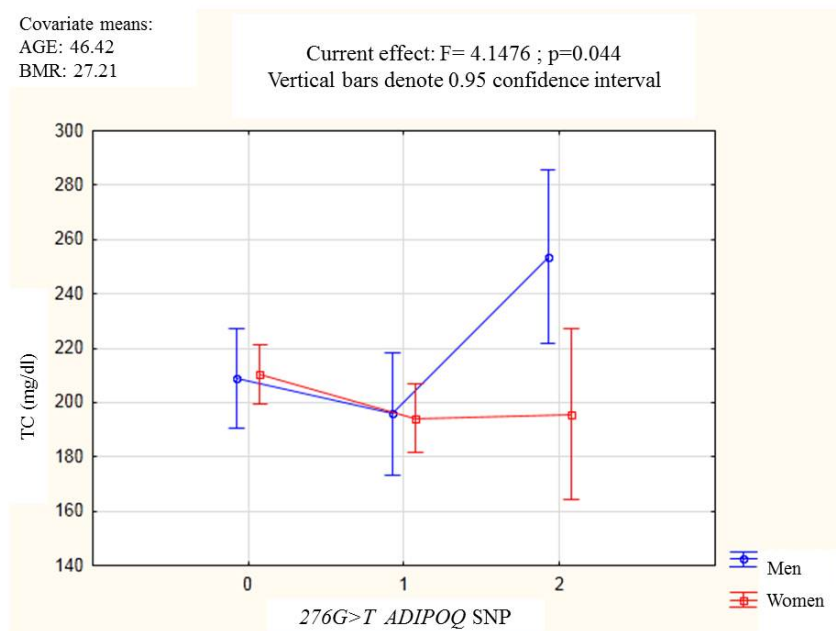


FIGURE 2: Multiple regression analysis, where the effect of the three possible 276G>T genotypes on TC levels were evaluated in men and women. GG genotype (0); GT genotype (1), and TT genotype (2).

DISCUSSION

The purpose of the present study was to investigate the 276G>T *ADIPOQ* variant effects on biochemical indicators and plasma adiponectin levels in a sample of a Southern Brazilian population of self-declared european ancestry. Our work consisted of a cross-section analysis which allowed the identification of important associations, where the modulation of observed effects was markedly dependent on the gender.

Despite the fact that no differences were found in adiponectin mean levels between men and women (4.41 ± 2.19 and 4.44 ± 1.99 , $p=0.628$, respectively), it is known that plasma levels of this protein exhibit sexual dimorphism (Arita *et al.* 1999), and our sample was not sufficiently large to observe this effect. Women have significantly higher serum concentrations than men (Haluzík *et al.* 2004) regardless of the fat mass amount and distribution (Cnop *et al.* 2003). Contributing to these differences several factors are found, including nutritional (Alsaleh *et al.* 2013), endocrine (Henneman *et al.* 2006), and

environmental, such as levels of physical activity (Saunders *et al.* 2012). Despite the heritability of plasma adiponectin levels may reach 88% (Cesari *et al.* 2007), it still shows gender variations: a study found that in men the genetic component contribution responsible for the variance in adiponectin levels was 34%, while in women no evidence of heritability was found (Miljkovic-Gacica *et al.* 2007).

Due to the multifactorial nature that controls adiponectin serum levels, the reproducibility of the studies associating genetic variants to this feature is low. Our results suggest that the 276G>T SNP contributed for the adiponectin levels variation only among men, conferring to heterozygotes (GT) higher mean levels when compared to common homozygotes (GG). The association of this SNP with adiponectin levels have been established through GWA studies (Pollin *et al.* 2005, Heid *et al.* 2006, Heid *et al.* 2010), and the association with traits related to metabolic syndrome, diabetes and atherogenic indicators shows heterogeneous results (Melistas *et al.* 2010, Zhao & Zhao 2011, Al-Daghri *et al.* 2012, Kawai *et al.* 2013, Pyrzak *et al.* 2013, Arikoglu *et al.* 2014), probably due to multiple factors that influence its modulation, in addition to methodological differences between studies.

Some work signaled to sex dependent effects, for example, the extensive study by Cheung and collaborators, which found 276G>T SNP association with coronary heart disease, and the T allele with hypoadiponectinaemia only in men (Cheung *et al.* 2014). Our findings also suggest that the SNP has differential effect on adiponectin levels and the lipoprotein metabolism in men, considering the detrimental effect that the rare allele in homozygous (TT) has conferred to carriers, contributing independently to increased levels of TC and LDL-C compared to common homozygous genotypes (GG) and heterozygous (GT). This result corroborates with others that suggest significant gender effect on the association between this variant and metabolic disorders (Khabour *et al.* 2013), and highlights the importance of future studies that consider stratification by gender in their analysis.

The steroid hormones act in adiponectin regulation and may influence the underlying mechanisms to variation of effect observed between the sexes. It was shown that castrated experimental animals had increased adiponectin levels, whereas when

under the effect of supplemental testosterone the adiponectin levels decreased, demonstrating the testosterone effects in reducing plasmatic adiponectin concentration (Nishizawa *et al.* 2002). In the same study it was observed that mRNA adiponectin levels were not affected by testosterone in vitro or in vivo, suggesting that the hormone may act on the secretory pathway, and not necessarily on the regulation of its nuclear production, but the exact dynamics of the androgens action in this setting remains unknown (Nishizawa *et al.* 2002).

In addition, the lipoproteins of lipid metabolism, and the enzymes that modulate it, also differ in their distribution and activity in a gender-dependant way, as they are regulated by steroid hormones (The Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee 1979, Nikkila *et al.* 1984, Taskinen & Kuusi 1986). In women, the hepatic lipase (HL) activity is around 60% to 70% of the activity found in men (Kuusi *et al.* 1989), besides lipoprotein lipase (LPL) higher activity compared to men (Nikkila *et al.* 1984, Taskinen & Kuusi 1986). Early in life, before the sex hormones action, HDL-C is similar between the sexes, but after puberty, decreases in boys and remains unchanged in girls (The Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee 1979).

It is suggested that activation of HL by testosterone is responsible for the decline in HDL-C levels (Sorva *et al.* 1988), and this difference remains in adult life. On the other hand, the LDL-C is lower in women, presumably due to the action of estrogens on the increase in LDL-C receptor (LDLR) activity (Kovanen *et al.* 1979), since after menopause this difference disappears between the sexes (The Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee 1979). Variations in lipid metabolism inherent to sex may also contribute to the heterogeneity and lack of reproducibility of studies investigating the effects of factors that interfere in energy homeostasis, among these, the effects of genetic variants in genes encoding proteins that modulate these key enzymes, such as *ADIPOQ*.

Despite the *ADIPOQ* gene variants have been associated with dyslipidemia (Hotta *et al.* 2000, Ryo *et al.* 2004), it is not clear whether there is a direct relationship between low adiponectin levels and this disease (Lara-Castro *et al.* 2007).

Often the 276G>T SNP association with metabolic disorders is not related to differences in plasma adiponectin (Gable *et al.* 2006, Heid *et al.* 2006), suggesting that in some cases the effect of the genetic variant may be independent of the circulating levels of the protein, as proposed by Qi (Qi *et al.* 2005). Likewise we propose that the 276G>T variant impacted independently on adiponectin levels and on lipid metabolism in men who composed our study, since there was no significant correlation between adiponectin levels and biochemical markers ($p>0.05$). Furthermore, the independence of these effects was also verified by disparity in genetic composition responsible for the observed differences: rare allele homozygotes (TT) had higher LDL-C and TC average levels (recessive effect), while on the adiponectin levels only individuals with heterozygous genotype (GT) showed increased serum levels (overdominance).

Despite the diversity of observed results, some mechanisms have been proposed to explain the adiponectin influence on lipid homeostasis. This adipokine acts on plasma lipoprotein levels altering the levels and activity of key enzymes of lipid metabolism, among them the LPL and HL, previously mentioned (Lara-Castro *et al.* 2007). LPL hydrolyzes triglycerides in chylomicrons and in the very low density lipoproteins (VLDL), releasing free fatty acids and giving rise to intermediate density lipoproteins (IDL). Part of the IDL is removed by the liver, but most of it is converted into LDL-C by HL (Kersten 2014). Transgenic mouse over expressing adiponectin showed increased expression and activity of LPL in skeletal muscle, and increased VLDL hydrolysis, thus leading to the decreased in TG levels (Qiao *et al.* 2008). Similar results were also described by Combs (Combs *et al.* 2004) where female mice super expressing adiponectin showed increased expression of LPL in white adipose tissue, and similar results were also found in similar studies in humans (Von Eynatten *et al.* 2004, De Vries *et al.* 2005). The increase in VLDL hydrolysis leads indirectly to decreased levels of total cholesterol. On the other hand, low levels of adiponectin are correlated with increased HL (Schneider *et al.* 2005) and decreased LPL activities (Saiki *et al.* 2007), which may lead to higher levels of LDL-C and reduction in HDL-C levels due to the combined effects of these two enzymes (Lara-Castro *et al.* 2007).

Given the complex nature which controls the lipoprotein and adiponectin circulating levels, the effect of SNP investigated in this study represents a small portion of many factors that contribute to the mechanisms underlying of these differences. We can state some limitations of our study, among them the relatively small sample size, because larger samples could reveal undetected effects of genotypic and allelic composition and confirm the effects found in this study. The replication of the tests in an independent sample of men would be interesting to validate our results, as well as the application of this study in postmenopausal women, which could provide similar results to those seen in men. We used only a premenopausal women sample for tests replication, whose results were similar to those found in the women group who composed the original sample

In conclusion we propose a gender dependent effect of the 276G>T polymorphism on adiponectin levels, TC and LDL-C, with the heterozygous genotype (GT) conferring higher levels of protein, while the rare homozygous genotype (TT) was associated with higher TC and LDL-C. It is also important to emphasize that the polymorphism influence on the levels of biochemical markers was independent of adiponectin circulating levels.

Acknowledgements

All the people who contributed to this study are listed as authors.

Funding

Grants and scholarships were received from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Araucaria Foundation.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Al-Daghri, N.M, Al-Attas, O.S., Alokail, M.S., Alkharfy, K.M., Hussain, T., Yakout, S., Vinodson, B., Sabico, S. (2012) Adiponectin gene polymorphisms (T45G and G276T),

adiponectin levels and risk for metabolic diseases in an Arab population. *Gene***493**, 142–147.

Alsaleh, A., Crepostnaia, D., Maniou, Z., Lewis, F.J., Hall, W.L., Sanders, T.A., O'Dell, S.D. MARINA study team. (2013) Adiponectin Gene Variant Interacts with Fish Oil Supplementation to Influence Serum Adiponectin in Older Individuals. *J. Nutr.* **143**, 1021–1027.

Arikoglu, H., Ozdemir, H., Kaya, D.E., Ipekci, S.H., Arslan, A., Kayis, S.A., Gonen, M.S. (2014) The Adiponectin variants contribute to the genetic background of type 2 diabetes in Turkish population. *Gene***534**, 10-6.

Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T. Matsuzawa, Y. *et al.*, (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **257**, 79–83.

Caselli, C. (2014) Role of adiponectin system in insulin resistance. *Mol. Genet. Metab.***113**, 155-160.

Cesari, M., Narkiewicz, K., De Toni, R., Aldighieri, E., Williams, C.J., Rossi, G.P. (2007) Heritability of plasma adiponectin levels and body mass index in twins. *J. Clin. Endocrinol.Metab.***92**, 3082–3088.

Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., Quon, M.J. (2003) Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J. Biol.Chem.* **278**, 45021–45026.

Cheung, C. Y. Y., Hui, E.Y., Cheung, B. M., Woo, Y. C., Xu, A., Fong, C.H., Ong, K.L., Yeung, C.Y., Janus, E.D., Tse, H.F., Sham, P.C. Lam, K.S. (2014) Adiponectin gene variants and the risk of coronary heart disease: a 16-year longitudinal study . *Eur. J. Endocrinol.* **171**, 107-115.

Cnop, M., Havel, P.J., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Sinha, M. K., Boyko, E. J., Retzlaff, B. M., Knopp, R.H., Brunzell, J. D., Kahn S.E. (2003) Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia***46**, 459–469.

Combs, T.B., Pajvani, U.B., Berg, A.H., Lin, Y., Jelicks, L.A., Laplante, M., Nawrocki, A.R., Rajala, M.V., Parlow, A.F., Cheeseboro, L., Ding, Y.Y., Russell, R.G., Lindemann, D., Hartley, A., Baker, G.R.C., Obici, S., Deshaies, Y., Ludgate, M., Rossetti, L., Scherer, P.E. (2004) A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology***145**, 367–383.

De Vries, R., Wolffenbuttel, B.H., Sluiter, W.J., VanTol, A., Dullaart, R.P. (2005) Post-heparin plasma lipoprotein lipase, but not hepatic lipase activity, is related to plasma adiponectin in type 2 diabetic patients and healthy subjects. *Clin. Lab.* **51**, 403–409.

Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., Lodish, H.F. (2001) Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **98**, 2005–2010.

Gable, D.R., Hurel, S.J., Humphries, S.E. (2006) Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis***188**, 231–244.

Gao, M., Ding, D., Huang, J., Qu, Y., Wang, Y., Huang, Q. (2013) Association of Genetic Variants in the Adiponectin Gene with Metabolic Syndrome: A Case-Control Study and a Systematic Meta-Analysis in the Chinese Population. *Plos One***8**, e58412.

Haluzík, M., Parízková, J., Haluzík, M.M. (2004) Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol. Res.* **53**, 123-129.

Hand, L.E., Usan, P., Cooper, G.J.S., Xu, L.Y., Ammori, B., Cunningham, P.S., Aghamohammadzadeh, R., Soran, H., Greenstein, A., Loudon, A.S.I., Bechtold, D.A., Ray, D.W. (2015) Adiponectin Induces A20 Expression in Adipose Tissue To Confer Metabolic Benefit. *Diabetes*.**64**, 128-36.

Heid, I.M., Henneman, P., Hicks, A., Coassin, S., Winkler, T., Aulchenko, Y.S., Fuchsberger, S., Song, K., Hivert, M.F., Waterworth, D.M. (2010) Clear detection of ADIPOQ locus as the major gene for plasma adiponectin: results of genome-wide association analyses including 4659 European individuals. *Atherosclerosis* **208**, 412–420.

Heid, I.M., Wagner, S.A., Gohlke, H., Iglseder, B., Mueller, J.C., Cip, P., Ladurner, G., Reiter, R., Stadlmayr, A., Mackevics, V., Illig, T., Kronenberg, F., Paulweber, B. (2006) Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes***55**, 375–384.

Heid, I.M., Wagner, S.A., Gohlke, H., Iglseder, B., Mueller, J.C., Cip, P., Ladurner, G., Reiter, R., Stadlmayr, A., Mackevics, V., Illig, T., Kronenberg, F. (2006) Genetic Architecture of the APM1 Gene and Its Influence on Adiponectin Plasma Levels and Parameters of the Metabolic Syndrome in 1727 Healthy Caucasians. *Diabetes* **55**, 375–384.

Henneman, P., Janssens, A.C., Zillikens, M.C., Frolich, M., Frants, R.R., Oostra, B.A., Van Duijn, C.M., Van Dijk, K.W. (2010) Menopause impacts the relation of plasma adiponectin levels with the metabolic syndrome. *J Intern Med.* **267**, 402-409.

Hotta, K., Funahashi, T., Arita, Y., Takahashi, M., Matsuda, M., Okamoto, Y., Iwahashi, H., Kuriyama, Y., Ouchi, N., Maeda, K., Nishida, M., Kihara, S., Sakai, N., Nakajima, T., Hasegawa, K., Muraguchi, M., Ohmoto, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y. (2000) Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1595–1599.

Kawai, T., Ohishi, M., Takeya, Y., Onishi, M., Ito, N., Yamamoto, K., Oguro, R., Kamide, R., Rakugi, H. (2013) Adiponectin single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for stroke through high pulse wave pressure: a cohort study. *J. Atheroscler. Thromb.* **22**, 152-160.

Kershaw, E.E., Flier, J.S. (2004) Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 2548–2556.

Kersten, S. (2014) Physiological regulation of lipoprotein lipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 919-933.

Khabour, O.F., Wehaibi, S.H., Al-Azzam, S.I., Alzoubi, K.H., El-Akawi, Z.J. (2013) Association of adiponectin with hypertension in type 2 diabetic patients: the gender effect. *Clin. Exp. Hypertens.* **35**, 361-366.

Kovanen, P.T., Brown, M.S., Goldstein, J.L. (1979) Increased binding of low density lipoproteins to liver membranes treated with 17 α -ethinyl estradiol. *J. Biol. Chem.* **254**, 11367-11373.

Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., Noda, T. (2002) Disruption adiponectin causes insulin resistance neointimal formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 25863–25866.

Kuusi, T., Ehnholm, C., Viikari, J., Harkonen, R., Vartiainen, E., Puska, P., Taskinen, M.R. (1989) Postheparin plasma lipoprotein and hepatic lipase are determinants of hypo- and hyperalphalipoproteinemia. *J. Lipid. Res.* **30**, 1117-1126.

Lahiri, D.K., NurnbergerJr, J.I. (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic.Acids.Res.* **19**, 5444.

Lara-Castro, C., Fu, Y., Chung, B. H., Garvey, W. T. (2007) Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology* **18**, 263–270.

Lu, J.F., Zhou, Y., Huang, G.H., Jiang, H.X., Hu, B.L., Qin, S.Y. (2014) Association of ADIPOQ polymorphisms with obesity risk: A meta-analysis. *Human Immunology* **75**, 1062–1068.

Melistas, L., Mantzoros, C.S., Kontogianni, M., Antonopoulou, S., Ordovas, J.M., Yiannakouris, N. (2009) Association of the +45T>G and +276G>T polymorphisms in the adiponectin gene with insulin resistance in nondiabetic Greek women. *Eur. J. Endocrinol.* **161**, 845-852.

Miljkovic-Gacica, I., Wangb, X., Kammererb, C.M., Bunkera, C.H., Wheelerc, V.W., Patrickc, A.L., Kullera, L.H., Evansa, R.W., Zmuda, J.M. (2007) Genetic determination of adiponectin and its relationship with body fat topography in multigenerational families of African heritage. *Metabolism* **56**, 234–238.

Nawrocki, A.R., Scherer, P.E. (2004) The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. *Curr.Opin.Pharmacol.***4**, 281–289.

Nikkila, E.A., Kuusi, T., Taskinen, M.R., Tikkanen, M. (1984) Regulation of lipoprotein metabolism by endothelial lipolytic enzymes, in Carlson LA, Olsson AG (eds), Treatment of Hyperlipoproteinemia. New York, Raven Press, 77-84.

Nishizawa, H., Shimomura, I., Kishida, K., Maeda, N., Kuriyama, H., Nagaretani, H., Matsuda, M., Kondo, H., Furuyama, N., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (2002) Androgens Decrease Plasma Adiponectin, an Insulin-Sensitizing Adipocyte-Derived Protein. *Diabetes***51**, 2734-2741.

Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, K., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., Yamashita, S., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (1999) Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocytederived plasma protein adiponectin. *Circulation***100**, 2473–2476.

Pollin, T.I., Tanner, K., O'Connell, J.R., Ott, S.H., Damcott, C.M., Shuldiner, A.R., McLenithan, J.C., Mitchell, B.D. (2005) Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the ADIPOQ gene. *Diabetes***54**, 268–274.

Pyrzak, B., Ruminska, M., Czerwonogrodzka-Senczyna, A., Majcher, A., Wisniewska, A., Brzewski, M., Demkow, U. (2013) Association of Adiponectin Gene G276T Polymorphism with Atherogenic Indicators in Obese Children. *Adv. Exp. Med. Biol.* **756**, 247-254.

Qi, L., Li, T., Rimm, E., Zhang, C., Rifai, N., Hunter, D., Doria, A., Frank, H.B. (2005) The 276 Polymorphism of the APM1 Gene, Plasma Adiponectin Concentration, and Cardiovascular Risk in Diabetic Men. *Diabetes***54**, 1607-1610.

Qiao, L., Zou, C., Van der Westhuyzen, D.R., Shao, J. (2008) Adiponectin Reduces Plasma Triglyceride by Increasing VLDL Triglyceride Catabolism. *Diabetes* **57**, 1824–1833.

Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibazaki, S., Takahashi, M., Nagai, M., Matsuzawa, Y., Funahashi, T. (2004) Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ. J.* **68**, 975–981.

Saiki, A., Oyama, T., Endo, K., Ebisuno, M., Ohira, M., Koide, N., Murano, T., Miyashita, Y., Shirai, K. (2007) Preheparin serum lipoprotein lipase mass might be a biomarker of metabolic syndrome. *Diabetes Res. Clin.Pract.* **76**, 93–101.

Saunders, T.J., Palombella, A., McGuire, K.A., Janiszewski, P.M., Després, J.P., Ross, R. (2012) Acute exercise increases adiponectin levels in abdominally obese men. *J. Nutr.Metab.* **2012**, 1-6.

Schneider, J.G., Von Eynatten, M., Schiekofer, S., Nawroth, P.P., Dugi, K.A. (2005) Low plasma adiponectin levels are associated with increased hepatic lipase activity in vivo. *Diabetes Care* **28**, 2181–2186.

Sorva, R., Kuusi, T., Dunkel, L., Taskinen, M.R. (1988) Effects of endogenous sex steroids on serum lipoproteins and post heparin plasma lipolytic enzymes. *J. Clin. Endocrinol.Metab.* **66**, 408-413.

Taskinen, M.R., Kuusi, T. (1986) High density lipoproteins in postprandial lipemia: Relation to sex and lipoprotein lipase activity. *Atherosclerosis* **9**, 121-130.

The Lipid Research Clinics Program Epidemiology Committee [no authors listed] (1979) Plasma lipid distribution in selected North American populations: The Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. *Circulation* **60** , 427-439.

Tomas, E., Tsao, T.S., Saha, A.K., Murrey, H.E., Zhang, Cc., Itani, S.I., Lodish, H.F., Ruderman, N.B. (2002) Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP activated protein kinase activation. *Proc. Natl.Acad.Sci. (USA)* **99**, 16309–16313.

Tudor-Locke, C., Craig, C.L., Brown, W.J., Clemes, A.S., De Cocker, K., Giles-Corti, B., Hatano, Y., Inoue, S., Matsudo, S.M., Mutrie, N., Oppert, J.M., Rowe, D.A., Schmidt, M.D., Schofield, G.M., Spence, J.C., Teixeira, P.J., Tully, M.A., Blair, N.S. (2011) How many steps/day are enough for adults? *Int. J. Behav. Nutr. Phys. Act.***8**, 1-17.

Von Eynatten, M., Schneider, J.G., Humpert, P.M., Rudofsky, G., Schmidt, N., Barosch, P., Hamann, A., Morcos, M., Kreuzer, J., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Dugi, K.A. (2004) Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: an association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care***27**, 2925–2929.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., Tataranni, P.A. (2001) Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J. Clin.Endocrinol.Metab.* **86**, 1930–1935.

Whitehead, J. P., Richards, A. A., Hickman, I. J., Macdonald, G. A., Prins, J. B. (2006) Adiponectin - a key adipokine in the metabolic syndrome. *Diabetes Obes.Met.***8**, 264–280.

Wyatt, H.R., Peters, J.C., Reed, G.W., Barry, M., Hill, J.O. (2005) A Colorado statewide survey of walking and its relation to excessive weight. *Med. Sci. Sports. Exerc.***37**, 724-730.

Zhao, T., Zhao, Z. (2011) Genetic effects of adiponectin on blood lipids and blood pressure. *Clin.Endocrinol.***74**, 214–222.

Supplementary Material

Means (\pm SE) of glucose, HDL-C, LDL-C, TG, TC and paired comparisons (p) among carriers of the three possible 276G>T SNP genotypes in independent sample of women (N=182).

Biochemical parameters	SNP 276G>T Genotypes			Comparisons	p
	GG ^A (n=84)	GT ^B (n=89)	TT ^C (n=9)		
Glucose (mg/dl)	88.41 \pm 14.64	90.31 \pm 21.51	89.77 \pm 6.99	AXB	0.483
				BXC	0.385
				AXC	0.209
HDL-C (mg/dl)	51.20 \pm 11.98	53.07 \pm 13.39	48.33 \pm 9.61	AXB	0.420
				BXC	0.223
				AXC	0.454
LDL-C (mg/dl)	110.71 \pm 31.14	110.35 \pm 27.80	108.86 \pm 27.26	AXB	0.912
				BXC	0.735
				AXC	0.870
TG (mg/dl)	146.09 \pm 83.86	130.40 \pm 52.65	147.33 \pm 50.21	AXB	0.410
				BXC	0.304
				AXC	0.447
TC (mg/dl)	191.19 \pm 37.12	189.51 \pm 35.44	186.66 \pm 37.16	AXB	0.762
				BXC	0.819
				AXC	0.729

Comparisons (p) between the parametric variables (TC) were performed by t-test; and between non-parametric variables (Glucose, HDL-C, LDL-C and TG) were performed by Mann-Whitney test.

CAPÍTULO III

“ASSOCIAÇÃO DOS SNPs Arg16Gly e Gln27Glu(*ADBR2*) e Trp64Arg (*ADBR3*) COM FATORES DE RISCO PARA SÍNDROME METABÓLICA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES EM FUNÇÃO DO GÊNERO”

RESUMO

Os receptores adrenérgicos beta possuem papel em contextos de obesidade e síndrome metabólica (SMet) devido ao processo de lipólise estimulado por catecolaminas do qual eles participam. Variantes dos genes codificadores dos receptores adrenérgicos beta 2 e 3 já foram associadas a traços metabólicos relacionados à SMet. Nosso estudo verificou a associação dos polimorfismos Arg16Gly e Gln27Glu do gene *ADBR2*, e Trp64Arg do gene *ADBR3* com variáveis preditoras da SMet (parâmetros antropométricos: IMC, razão cintura/estatura, total de massa magra, total de gordura, e taxa metabólica basal; bioquímicos: níveis de glicemia, insulina, e perfil lipídico e de imagem: espessura da gordura visceral e espessamento da carótida) em uma amostra populacional composta por 213 indivíduos saudáveis de ancestralidade Euro-Brasileira. Resultados marcadamente dependentes do gênero foram encontrados. O polimorfismo Arg16Gly apresentou efeito, somente entre as mulheres, sobre os níveis médios de glicose ($p=0,03$), médias de IMC ($p=0,02$) e quantidade de massa magra ($p=0,03$). Gln27Glu foi associado ao espessamento médio intimal (EMI) da carótida em homens ($p=0,04$) e mulheres ($p=0,02$), porém, seu efeito sobre os níveis de glicose foi exclusivo em homens ($p=0,04$). A variável Trp64Arg do gene *ADBR3* apresentou efeito somente em homens, sobre os níveis médios de HDL-C ($p=0,02$) e EMI ($p=0,009$). Nossos resultados sugerem um papel preponderante da variável Arg16Gly na variação observada dos parâmetros de risco para SMet em mulheres, enquanto que os polimorfismos Gln27Glu e Trp64Arg parecem exercer mais influência sobre estas variáveis em homens. Uma possível interação entre fatores hormonais e fisiológicos inerentes ao sexo pode estar modulando o efeito dos SNPs sobre estes parâmetros, influenciando assim os efeitos diferenciais observados entre homens e mulheres.

INTRODUÇÃO

Os receptores adrenérgicos pertencem a uma grande família de receptores acoplados à proteína G. Em específico, os receptores adrenérgicos beta (RA-B) são ligados ao subtipo Gs, que lhes confere ação agonista em resposta às catecolaminas, principalmente adrenalina e noradrenalina (NETO; RASCADO; BENDHACK, 2006).

Devido às propriedades bem conhecidas das catecolaminas sobre as funções cardiovasculares, e, dentre estas, o papel das agonistas dos RAs-B na broncodilatação, a funcionalidade dos receptores adrenérgicos beta, bem como dos polimorfismos nos seus genes codificadores, são bem estudados nos contextos das cardiomiopatias (LIGGETT *et al.*, 1998; SZENTMIKLOSI *et al.*, 2015) e asma (ISRAEL *et al.*, 2000; TSAI *et al.*, 2006). A asma já foi associada ao IMC (índice de massa corporal) em um estudo que propôs que pelo menos 8% dos componentes genéticos que conferem suscetibilidade à obesidade são os mesmos que predisõem à asma (HALLSTRAND *et al.*, 2005).

Os três subtipos de RAs-B (RA-B1, B2, B3) são expressos nos adipócitos branco e marrom (BACHMAN *et al.*, 2002). Quando estimulados por catecolaminas no tecido adiposo branco, os RAs-B promovem a lipólise por meio da ativação da adenililciclase, aumento da concentração intracelular da cAMP e ativação da PKA (proteína kinase cAMP dependente), responsável por ativar a enzima lipase hormônio sensível (LHS) e a perilipina 1 (PLIN 1), culminando no processo de lipólise (HONNOR; DHILLON; LONDOS, 1985; CLIFFORD *et al.*, 2000). Outras vias, diferentes deste caminho clássico, incluindo a ativação do ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) e da p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), e em alguns casos independentes da ativação da PKA são propostos, porém, seus mecanismos moleculares não estão totalmente compreendidos (COLLINS; CAO; ROBIDOUX, 2004; ROBIDOUX *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007).

A sinalização por catecolaminas no tecido adiposo marrom ocorre principalmente via RA-B3 que também ativa a PKA, que por sua vez atua aumentando a expressão dos genes codificadores da proteína PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated*

receptor-γ coactivator-1a), e UCP1 (proteína desacopladora1), responsável por desacoplar a formação do ATP a partir da combustão de substratos na cadeia respiratória, gerando assim calor (processo de termogênese) (CANNON; NEDERGAARD, 2004; COLLINS; YEHUDA-SHNAIDMAN; WANG, 2010).

Devido a importância dos receptores adrenérgicos beta no processo de lipólise, variações na sua estimulação, associados aos polimorfismos em seus genes codificadores, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da obesidade induzida por resistência a catecolaminas (ENOCKSSON *et al.*, 2000; MO *et al.*, 2007), efeitos prejudiciais na termogênese, oxidação lipídica e lipólise em indivíduos obesos (SCHIFFELERS *et al.*, 2001), e vários distúrbios metabólicos associados à síndrome metabólica (BOYDA *et al.*, 2013; LAI *et al.*, 2014).

Considerando a importância funcional dos RAs-B para o metabolismo energético, e o impacto que polimorfismos genéticos relativamente frequentes podem representar, investigamos a possível associação dos SNPs: Arg16Gly e Gln27Glu do gene *ADBR2*, e o Trp64Arg do gene *ADBR3*, com componentes isolados da síndrome metabólica em uma amostra populacional de ancestralidade Euro-Brasileira da região sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi composta por 213 indivíduos saudáveis de descendência Euro-Brasileira, os quais voluntariamente participaram do trabalho. Com o objetivo de selecionarmos uma amostra representativa da heterogeneidade populacional, nenhum critério de exclusão ou inclusão foi adotado. Deste total, 75 são homens (com idades entre 26–59 anos, sendo que 66% deles apresentaram obesidade ou sobrepeso), e 138 são mulheres (com idades entre 25 – 70 anos, sendo que 60,9% delas apresentaram obesidade ou sobrepeso) (IMC \geq 25 = sobrepeso; IMC \geq 30=obeso).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (CEP/SD 1159.084.11.06/ CAAE0082.0.091.000-11).

Parâmetros Antropométricos

Os procedimentos de obtenção das variáveis antropométricas seguiram o *Anthropometric Indicators Measurement Guide* (COGILL, 2003). As medidas de massa (Kg) e estatura (m) foram obtidas com acurácia de 0,1 Kg e 0,1 m respectivamente, e com elas calculamos o IMC (índice de massa corporal - $IMC = \text{massa kg} / \text{altura m}^2$) dos 213 indivíduos da amostra.

A medida de cintura (cm), com resolução de 0,1mm para o cálculo da razão cintura/estatura foi obtida de 154 indivíduos.

As medidas de composição corporal foram obtidas de 121 indivíduos apenas, devido à desistência de alguns participantes no decorrer do projeto. O total de gordura (kg), total de massa magra (kg), e TMB (taxa metabólica basal = gasto energético (Kcal) por dia) foram obtidas com o aparelho Maltron 906 tetrapolar. Foram aferidos os valores com os indivíduos em jejum de no mínimo 4 horas, em decúbito dorsal, posicionando os eletrodos no dorso dos pés e mãos, próximos às articulações metacarpofalangeanas e metatarsofalangeanas, respectivamente. Os valores de impedância bioelétrica foram validados de acordo com RODRIGUES *et al.*, 2001.

Parâmetros Bioquímicos

As coletas de sangue foram realizadas no total de amostras (213 indivíduos) em jejum de 8 a 12 horas, e os níveis de glicemia (mg/dL), insulina ($\mu\text{UI}/\text{MI}$), HDL-C (high-density-lipoprotein) (mg/dL), CT (colesterol total) (mg/dL), TG (triglicerídeos) (mg/dL) e LDL-C (low-density-lipoprotein) (mg/dL) foram obtidos por métodos automatizados.

Parâmetros de imagem

Medidas de ultrassonografia intra-abdominal, para avaliar a quantidade de gordura visceral, e medidas da espessura da carótida foram obtidas de 120 indivíduos como aparelho ultra-som LOGIQ Book (GE - Medical Systems®), com transdutor linear (10Lb-RS) de 3,5 MHz, seguindo a metodologia proposta por Vlachos *et al.* (2007).

Para a obtenção da imagem intra-abdominal foi posicionando o transdutor entre 1 a 5 cm acima do umbigo na linha xifo-umbilical (linha central entre o processo xifoide e umbigo). A espessura da gordura visceral correspondeu à distância entre a parede anterior da artéria aorta e a superfície posterior do músculo reto abdominal, sendo mensurada em cm. Três imagens consecutivas foram obtidas de cada indivíduo e a média dos três valores de espessura foi utilizada.

Para a obtenção das imagens da carótida utilizamos o transdutor linear com frequência > 7 MHz e alta resolução em modo B, com profundidade do campo entre 30–40 mm, *frame rate* ideal de 25 Hz (>15 Hz). A espessura médio intimal da carótida (EMI) foi mensurada nos indivíduos em decúbito dorsal, e cabeça voltada lateralmente, identificando-se a carótida comum, localizada a 1-2 cm da bifurcação carotídea, bilateralmente, na parede posterior do vaso. O cálculo para a obtenção da EMI incluiu a distância entre a linha íntima-média e a média adventícia, em milímetros, utilizando-se o valor médio obtido de três mensurações. Para cada indivíduo foi calculada a média dos valores da espessura médio-intimal da carótida do lado direito (EMId), da espessura médio-intimal da carótida do lado esquerdo (EMle), e a média dos valores de EMId e EMle foi definida como espessura médio-intimal da carótida (EMI) (ENGELHORN *et al.*, 2010; LORENZ *et al.*, 2007).

Investigação dos SNPs

Três SNPs em dois genes codificadores de receptores adrenérgicos beta foram genotipados: Arg16Gly (rs1042713; G>A) e Gln27Glu (rs1042414; C>G) do gene *ADRB2*; Trp64Arg (rs4994; T>C) do gene *ADRB3*, no total da amostra (213 indivíduos)

O DNA foi extraído do sangue periférico total pelo método de salting-out (LAHIRI; NURNBERGER Jr, 1991), e diluído para concentração final de 20ng/μL. As genotipagens foram realizadas por meio do ensaio de discriminação alélica *TaqMan*, utilizando o equipamento 7500TM real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as condições: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; e 50 ciclos de 15 segundos a 95°C intercalados por 1 minuto a 62°C.

Análise Estatística

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs foram obtidas por contagem direta, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o teste de χ^2 .

O teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis antropométricas, bioquímicas, e de imagem analisadas. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste t, quando as variáveis eram paramétricas, e pelo teste de Mann-Whitney, quando as variáveis eram independentes e não paramétricas. As diferenças dentro de cada grupo, e entre os grupos, foram analisadas usando o teste de Kruskal-Wallis.

O valor de probabilidade para os testes comparativos foi considerado significativo quando $p < 0,05$ (5%).

RESULTADOS

Análise descritiva da amostra

Os genótipos dos três SNPs encontrados em nossa amostra estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), e suas frequências alélicas e genotípicas estão demonstradas na Tabela 1.

TABELA 1 - FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs Arg16Gly, Gln27Glu DO GENE *ADBR2* E Trp64Arg DO GENE *ADBR3*

Arg16Gly		Gln27Glu		Trp64Arg	
Gly16	59,62% \pm 0,01	Gln27	65,50% \pm 0,01	Trp64	92,49% \pm 0,00
Arg16	40,38% \pm 0,01	Glu27	34,50% \pm 0,01	Arg64	7,51% \pm 0,00
Arg16Arg (n=31)	14,50%	Gln27Gln (n=90)	42,25%	Trp64Trp (n=182)	85,45%
Arg16Gly (n=110)	51,64%	Gln27Glu (n=99)	46,48%	Trp64Arg (n=30)	14,08%
Gly16Gly (n=72)	33,80%	Glu27Glu (n=24)	11,27%	Arg64Arg (n=01)	0,46%

O alelo Glu27 do SNP Gln27Glu foi significativamente mais frequente no grupo das mulheres, como mostra a Tabela 2.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DOS SNPs Arg16Gly, Gln27Glu DO GENE *ADBR2* E Trp64Arg DO GENE *ADBR3* ENTRE HOMENS E MULHERES

	Arg16Gly		Gln27Glu		Trp64Arg	
	Arg16	Gly16	Gln27	Glu27	Trp64	Arg64
Homens	46%±0,02	54%±0,02	73,3%±0,01	26,6%±0,01	92,0%±0,00	0,08%±0,00
Mulheres	37,3%±0,01	62,7%±0,01	61,2%±0,01	38,8%±0,01	92,8%±0,00	0,07%±0,00
Comparação	$\chi^2=2,69$	p=0,1	$\chi^2=5,77$	p=0,01	$\chi^2=0,01$	p=0,92

As médias de todos os parâmetros mensurados em homens e mulheres da amostra, bem como suas comparações, constam na Tabela 3. Comparativamente às mulheres, os homens apresentaram níveis médios significativamente maiores de glicose e triglicerídeos, e menores de HDL-C; além de maior média de quantidade de massa magra e TMB (taxa metabólica basal (Kcal) por dia).

TABELA 3 - COMPARAÇÃO ENTRE AS MÉDIAS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, ANTROPOMÉTRICOS, E DE IMAGEM ENTRE HOMENS E MULHERES QUE COMPUSERAM A AMOSTRA

	Parâmetros	Homens	N Homens	Mulheres	N Mulheres	p
Parâmetros bioquímicos	Insulina (μ UI/MI)	9,19±4,85	75	10,19±9,15	138	0,803
	Glicose (mg/dl)	85,85±9,19	75	84,00±19,42	138	0,007
	HDL-C (mg/dl)	43,99±8,79	75	53,29±13,67	138	0,000
	LDL-C (mg/dl)	134,82±31,68	75	129,47±31,95	138	0,708
	TG (mg/dl)	150,89±78,77	75	120,31±59,47	138	0,004
	CT (mg/dl)	208,21±35,31	75	205,77±38,70	138	0,878
Parâmetros antropométricos	IMC	27,02±3,94	75	27,20±5,45	138	0,937
	RazãoCint/Est	0,553±0,06	43	0,551±0,09	111	0,690
	Massa magra Kg	58,87± 8,93	35	43,23± 4,76	85	0,000
	Massa gordura Kg	23,71±9,61	35	25,59±11,25	85	0,503
	TMB ⁽¹⁾ (Kcal/dia)	1750,43±452,3	35	1287,03±100,5	85	0,000
Imagem	Abdomen (mm)	6,271±1,98	35	5,55±1,95	85	0,086
	EMI ⁽²⁾ (mm)	0,057±0,01	35	0,058±0,01	85	0,727

NOTA: (1) TMB (Taxa Metabólica Basal); (2) EMI (Espessura Médio Intimal) da carótida

Análise da influência dos SNPs investigados sobre os parâmetros bioquímicos

Considerando as diferenças entre as médias das variáveis antropométricas e bioquímicas entre homens e mulheres, além da diferença observada entre a frequência alélica do SNP Gln27Glu, estratificamos a amostra por gênero para avaliarmos os possíveis efeitos dos três polimorfismos investigados sobre os parâmetros mensurados.

Observamos efeito do SNP Arg16Gly somente sobre os níveis de glicose. Na amostra em geral, os portadores homozigotos do alelo Gly16 apresentaram maior nível médio de glicose comparados aos heterozigotos (Arg16Gly) ($p=0,025$), e aos heterozigotos e homozigotos Arg16 agrupados (Arg16Gly+Arg16Arg) ($p=0,024$). No entanto, ao estratificar a amostra por gênero, o efeito sobre os níveis de glicose permaneceu apenas entre as mulheres, como é possível observar na Tabela 4. As homozigotas (Gly16Gly) apresentaram maiores níveis de glicose em jejum comparadas às portadoras do genótipo heterozigoto (Arg16Gly) ($p=0,003$), e também comparadas as heterozigotas e homozigotas Arg16 agrupadas ($p=0,007$).

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS (p) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM HOMENS E MULHERES ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO Arg16Gly DO GENE *ADBR2*.

Parâmetros Bioquímicos	Arg16Arg ^A (n=14)	Arg16Gly ^B (n=41)	Homens Gly16Gly ^C (n=20)	Comparação	p	Arg16Arg ^A (n=17)	Arg16Gly ^B (n=69)	Mulheres Gly16Gly ^C (n=52)	Comparação	p
Insulina (μ UI/MI)	8,00 \pm 3,43	9,69 \pm 5,899	8,59 \pm 1,92	AXB	0,729	8,55 \pm 3,97	8,91 \pm 4,08	12,95 \pm 14,65	AXB	0,841
				BXC	0,939				BXC	0,761
				AXC	0,581				AXC	0,616
Glicose (mg/dl)	82,71 \pm 8,80	86,14 \pm 8,56	87,45 \pm 10,57	AXB	0,274	82,18 \pm 10,40	83,14 \pm 25,38	85,75 \pm 10,72	AXB	0,254
				BXC	0,700				BXC	0,003
				AXC	0,220				AXC	0,460
HDL-C (mg/dl)	42,57 \pm 7,81	45,05 \pm 9,25	42,80 \pm 8,61	AXB	0,480	52,65 \pm 18,60	54,46 \pm 13,38	51,94 \pm 12,29	AXB	0,391
				BXC	0,255				BXC	0,349
				AXC	1,000				AXC	0,706
LDL-C (mg/dl)	126,73 \pm 33,39	137,61 \pm 33,00	134,74 \pm 28,08	AXB	0,293	134,26 \pm 42,26	126,40 \pm 32,55	131,98 \pm 27,26	AXB	0,404
				BXC	0,739				BXC	0,319
				AXC	0,454				AXC	0,796
TG (mg/dl)	154,78 \pm 94,09	150,00 \pm 82,31	150,00 \pm 61,89	AXB	0,976	143,11 \pm 70,50	113,71 \pm 57,37	121,61 \pm 57,61	AXB	0,091
				BXC	0,644				BXC	0,481
				AXC	0,752				AXC	0,215
CT (mg/dl)	196,64 \pm 36,25	212,73 \pm 35,94	207,05 \pm 33,05	AXB	0,154	215,12 \pm 47,48	203,65 \pm 37,10	205,52 \pm 36,84	AXB	0,292
				BXC	0,554				BXC	0,731
				AXC	0,391				AXC	0,389

NOTA: A corresponde ao genótipo Arg16Arg; B ao genótipo Arg16Gly, e C ao genótipo Gly16Gly

O outro SNP do gene *ADBR2*(Gln27Glu) também apresentou efeito somente sobre os níveis médios de glicose, mas desta vez apenas entre os homens que compuseram a amostra; este mesmo efeito não apareceu quando testamos sobre a amostra total. Os homens heterozigotos (Gln27Glu) apresentaram níveis médios de glicose maiores comparados aos portadores em homozigose do alelo mais comum (Gln27Gln) ($p=0.047$) (Tabela 5).

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS (p) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM HOMENS E MULHERES ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO Gln27Glu DO GENE *ADBR2*.

Parâmetros Bioquímicos	Homens					Mulheres				
	Gln27Gln ^A (n=39)	Gln27Glu ^B (n=32)	Glu27Glu ^C (n=4)	Comparações	p	Gln27Gln ^A (n=51)	Gln27Glu ^B (n=67)	Glu27Glu ^C (n=20)	Comparações	p
Insulina (μ UI/MI)	9,34 \pm 3,97	9,24 \pm 6,18	7,20 \pm 0,01	AXB	0,602	8,43 \pm 3,61	9,75 \pm 4,87	17,49 \pm 23,11	AXB	0,367
				BXC	1,000				BXC	0,663
				AXC	0,353				AXC	0,905
Glicose (mg/dl)	84,76 \pm 11,18	87,37 \pm 6,49	84,25 \pm 4,71	AXB	0,047	81,00 \pm 9,62	85,63 \pm 25,90	86,25 \pm 10,26	AXB	0,991
				BXC	0,279				BXC	0,149
				AXC	0,933				AXC	0,110
HDL-C (mg/dl)	43,35 \pm 7,40	45,44 \pm 10,22	38,50 \pm 8,18	AXB	0,502	54,27 \pm 15,27	53,80 \pm 13,20	49,05 \pm 10,36	AXB	0,971
				BXC	0,166				BXC	0,310
				AXC	0,305				AXC	0,257
LDL-C (mg/dl)	129,34 \pm 35,11	140,06 \pm 25,68	146,20 \pm 38,40	AXB	0,154	134,92 \pm 34,49	124,22 \pm 29,90	133,14 \pm 30,62	AXB	0,074
				BXC	0,671				BXC	0,247
				AXC	0,369				AXC	0,840
TG (mg/dl)	160,02 \pm 91,92	140,28 \pm 63,78	146,75 \pm 41,07	AXB	0,631	122,54 \pm 61,03	118,71 \pm 60,83	119,95 \pm 53,15	AXB	0,785
				BXC	0,705				BXC	0,686
				AXC	0,834				AXC	0,933
CT (mg/dl)	203,48 \pm 38,93	213,31 \pm 29,31	213,50 \pm 45,46	AXB	0,242	211,18 \pm 44,81	201,52 \pm 35,07	206,20 \pm 33,22	AXB	0,191
				BXC	0,990				BXC	0,597
				AXC	0,631				AXC	0,654

NOTA: A corresponde ao genótipo Arg16Arg; B ao genótipo Arg16Gly, e C ao genótipo Gly16Gly

Para a análise dos efeitos do SNP Trp64Arg do gene *ADBR3* sobre todos os parâmetros mensurados, agrupamos os genótipos portadores do alelo raro (Trp64Arg + Arg64Arg), devido à baixa frequência do mesmo.

Não encontramos efeito deste SNP na amostra total, no entanto, após a estratificação, constatamos que os homens portadores do alelo raro (Arg64) apresentaram maiores níveis de HDL-C comparados aos não portadores (Trp64Trp) ($p=0,029$) Tabela 6. Nenhum outro parâmetro bioquímico demonstrou ser influenciado pelo SNP Trp64Arg.

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS (p) DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM HOMENS E MULHERES ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS AGRUPADOS DO POLIMORFISMO Trp64Arg DO GENE *ADBR3*

Parâmetros Bioquímicos	Homens			Mulheres		
	Trp64Trp (n=63)	Trp64Arg + Arg64Arg(n=12)	p	Trp64Trp (n=119)	Trp64Arg + Arg64Arg(n=19)	p
Insulina (μ UI/MI)	8,94 \pm 5,0	9,92 \pm 4,57	0,376	10,69 \pm 9,83	7,67 \pm 3,60	0,114
Glicose (mg/dl)	86,63 \pm 9,19	81,75 \pm 8,36	0,102	84,36 \pm 20,59	81,78 \pm 9,21	0,636
HDL-C (mg/dl)	42,80\pm7,63	50,16\pm11,94	0,029	53,51 \pm 14,13	51,89 \pm 10,55	0,967
LDL-C (mg/dl)	134,17 \pm 32,02	138,19 \pm 30,95	0,690	130,70 \pm 32,72	121,74 \pm 26,08	0,258
TG (mg/dl)	147,87 \pm 72,93	166,75 \pm 106,92	0,845	119,55 \pm 57,00	125,05 \pm 74,76	0,724
CT (mg/dl)	206,46 \pm 35,84	217,42 \pm 32,20	0,327	207,03 \pm 39,63	197,84 \pm 32,05	0,338

Análise da influência dos SNPs investigados sobre os parâmetros antropométricos e de imagem

O efeito destes SNPs sobre estes parâmetros também foi marcadamente dependente de gênero, uma vez que ao analisarmos a amostra como um todo nenhuma associação foi encontrada ($p>0,05$) (dados não apresentados). O IMC e a quantidade de massa magra foram os parâmetros antropométricos que sofreram influência dos polimorfismos nos genes *ADBR2* e *ADBR3*, e, a espessura médio-intimal da carótida foi o parâmetro de imagem afetado pelos SNPs.

As mulheres heterozigotas para o SNP Arg16Gly apresentaram maior média de quantidade de massa magra, comparadas as homozigotas para o alelo comum (Arg16Arg) ($p=0,027$) (Tabela 7).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS (p) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E DE IMAGEM EM HOMENS E MULHERES ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO Arg16Gly DO GENE *ADBR2*.

Parâmetros	Homem				Mulher					
	Arg16Arg ^A (n=4)*	Arg16Gly ^B (n=21)*	Gly16Gly ^C (n=10)*	p	Arg16Arg ^A (n=12)*	Arg16Gly ^B (n=46)*	Gly16Gly ^C (n=27)*	p		
IMC	28,10±4,06	27,03±4,38	26,05±2,55	AXB	0,390	25,90±5,45	26,59±5,07	28,34±5,79	AXB	0,624
				BXC	0,372				BXC	0,063
				AXC	0,075				AXC	0,134
RazãoCint/ Est	0,551±0,10	0,558±0,08	0,539±0,04	AXB	0,584	0,554±0,10	0,536±0,08	0,554±0,09	AXB	0,637
				BXC	0,264				BXC	0,060
				AXC	0,856				AXC	0,571
Massa magra Kg	58,95±10,63	60,31±9,24	55,79±7,66	AXB	0,629	41,00±4,20	43,91±4,32	43,25±5,48	AXB	0,027
				BXC	0,190				BXC	0,360
				AXC	0,832				AXC	0,243
Massa gorda Kg	20,95±11,55	25,53±10,96	21,01±4,31	AXB	0,299	23,77±12,60	24,91±10,10	27,55±11,23	AXB	0,651
				BXC	0,228				BXC	0,248
				AXC	0,357				AXC	0,300
TMB (Kcal/dia)	1651,25±268,5	1829,38±544,6	1624,30±230,4	AXB	0,553	1258,50±93,1	1298,89±74,3	1279,79±135,7	AXB	0,166
				BXC	0,300				BXC	0,100
				AXC	0,943				AXC	0,779
Abdomen (mm)	5,46±1,00	6,70±2,04	5,69±2,04	AXB	0,252	5,77±1,91	5,35±2,12	5,79±1,70	AXB	0,546
				BXC	0,206				BXC	0,361
				AXC	0,839				AXC	0,967
EMI (mm)	0,054±0,01	0,059±0,01	0,052±0,00	AXB	0,528	0,056±0,01	0,057±0,01	0,058±0,00	AXB	0,877
				BXC	0,087				BXC	1,000
				AXC	0,887				AXC	0,941

NOTA: *O N referente ao IMC para homens foi: Arg16Arg (n=17); Arg16Gly (n=39); Gly16Gly (n=19); para mulheres: Arg16Arg (n=17); Arg16Gly (n=69); Gly16Gly (n=52). O N referente à razão cintura/estatura para homens foi: Arg16Arg (n=7); Arg16Gly (n=25); Gly16Gly (n=11); para mulheres: Arg16Arg (n=15); Arg16Gly (n=59); Gly16Gly (n=37).

Além disso, quando analisamos de forma agrupada os genótipos do SNP Arg16Gly, encontramos um efeito recessivo sobre as médias de IMC entre as mulheres. As portadoras em homozigose do alelo Gly16 apresentaram maior média de IMC comparadas às homozigotas para o alelo Arg16 agrupadas com as heterozigotas (Arg16Gly), ($28,34 \pm 5,79$ versus $26,37 \pm 5,12$; $p=0,039$, respectivamente). Quando analisamos os genótipos separadamente o valor de p indicou apenas tendência estatística ($p=0,063$) (Tabela 7).

Já os SNPs Gln27Glu do gene *ADBR2*, e o SNP Trp64Arg do gene *ADBR3*, apresentaram efeito sobre os valores da espessura médio intimal da carótida. O SNP Gln27Glu influenciou as médias em homens e mulheres, porém com efeitos diferenciados dos genótipos: homens heterozigotos apresentaram maiores médias de EMI comparados aos homozigotos para o alelo raro (Glu27Glu) ($p=0,044$); enquanto que entre as mulheres o efeito foi o oposto: mulheres heterozigotas apresentaram em média menor EMI comparadas às homozigotas comuns (Gln27Gln) ($p=0,022$) (Tabela 8).

Já o efeito do SNP Trp64Arg do gene *ADBR3* sobre os valores de EMI apareceu somente entre os homens: portadores do alelo raro (Trp64Arg+ Arg64Arg) apresentaram maior média de EMI comparados aos não portadores (Tabela 9).

TABELA 8 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS (p) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E DE IMAGEM EM HOMENS E MULHERES ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO Gln27Glu DO GENE *ADBR2*.

Parâmetros	Gln27Gln ^A (n=18)*	Gln27Glu ^B (n=15)*	Homem Glu27Glu ^C (n=2)*		p	Gln27Gln ^A (n=33)*	Gln27Glu ^B (n=42)*	Mulher Glu27Glu ^C (n=10)*		p
IMC	27,50±4,22	26,58±3,59	24,59±2,14	AXB	0,332	26,62±5,07	27,23±5,37	28,74±6,70	AXB	0,512
				BXC	0,357				BXC	0,299
				AXC	0,246				AXC	0,154
RazãoCint/Est	0,547±0,07	0,565±0,05	0,520±0,03	AXB	0,141	0,550±0,08	0,553±0,09	0,544±0,09	AXB	0,947
				BXC	0,140				BXC	0,870
				AXC	0,745				AXC	0,852
Massa magra Kg	58,81±10,62	59,03±7,24	58,15±7,84	AXB	0,913	43,13±4,65	43,73±4,93	41,95±4,57	AXB	0,526
				BXC	0,823				BXC	0,363
				AXC	0,850				AXC	0,429
Massa gorda Kg	24,54±11,56	23,36±7,51	18,90±4,66	AXB	0,985	25,73±11,50	25,02±11,04	27,78±12,32	AXB	0,813
				BXC	0,502				BXC	0,505
				AXC	0,570				AXC	0,581
TMB (Kcal/dia)	1848,88±599,84	1636,80±181,98	1716,50±71,40	AXB	0,128	1278,42±80,43	1302,67±112,96	1248,20±99,00	AXB	0,356
				BXC	0,412				BXC	0,176
				AXC	0,949				AXC	0,350
Abdomen (mm)	6,22±1,76	6,41±2,33	5,62±1,99	AXB	0,789	5,73±1,78	5,47±2,16	5,32±1,64	AXB	0,580
				BXC	0,652				BXC	0,836
				AXC	0,653				AXC	0,520
EMI (mm)	0,056±0,01	0,059±0,01	0,046±0,00	AXB	0,612	0,060±0,01	0,055±0,00	0,063±0,01	AXB	0,022
				BXC	0,044				BXC	0,068
				AXC	0,147				AXC	0,773

NOTA: *O N referente ao IMC para homens foi: Gln27Gln (n=42); Gln27Glu (n=30); Glu27Glu (n=3); para mulheres: Gln27Gln (n=52); Gln27Glu (n=67); Glu27Glu (n=19). O N referente a razão cintura/estatura para homens foi: Gln27Gln (n=25); Gln27Glu (n=16); Glu27Glu (n=2); para mulheres: Gln27Gln (n=45); Gln27Glu (n=55); Glu27Glu (n=11)

A corresponde ao genótipo Gln27Gln; B ao genótipo Gln27Glu, e C ao genótipo Glu27Glu

TABELA 9 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS (p) DOS PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E DE IMAGEM EM HOMENS E MULHERES ESTRATIFICADA PELOS GENÓTIPOS AGRUPADOS DO POLIMORFISMO Trp64Arg DO GENE *ADBR3*

Parâmetros	Homens			Mulheres		
	Trp64Trp (n=27)*	Trp64Arg + Arg64Arg(n=8)*	p	Trp64Trp (n=72)*	Trp64Arg + Arg64Arg(n=13)*	p
IMC	26,62 ±3,77	28,82 ±4,32	0,057	27,24 ±5,42	27,01 ±6,10	0,868
RazãoCint/Est	0,544±0,06	0,573 ±0,06	0,329	0,551±0,09	0,550 ±0,09	0,993
Massa magra Kg	72,72 ±6,62	70,20 ±5,73	0,768	43,59 ±4,91	41,85±3,76	0,169
Massa gorda Kg	23,51±10,24	24,40±7,65	0,679	25,75±11,12	25,28±12,63	0,674
TMB (Kcal/dia)	1687,26±191,6	1963,62±888,8	0,968	1290,08±105,8	1271,00±70,4	0,501
Abdomen (mm)	6,28±2,13	6,23±1,50	0,955	5,57±1,97	5,53±2,01	0,947
EMI (mm)	0,054±0,00	0,065±0,01	0,009	0,058±0,01	0,054±0,00	0,198

NOTA: O N referente ao IMC para homens foi: Trp64Trp (n=61); Trp64Arg + Arg64Arg (n=14); para mulheres: Trp64Trp (n=119); Trp64Arg + Arg64Arg (n=19);
O N referente à razão cintura/estatura para homens foi: Trp64Trp (n=31); Trp64Arg + Arg64Arg (n=12); para mulheres: Trp64Trp (n=94); Trp64Arg + Arg64Arg (n=17);

DISCUSSÃO

Diferenças metabólicas inerentes ao sexo

Os resultados obtidos no presente estudo foram marcadamente dependentes do gênero. As diferenças das vias metabólicas energéticas inerentes ao sexo são bem conhecidas e refletem-se em diferenças nos parâmetros bioquímicos e antropométricos entre homens e mulheres, como foi observado também em nossos achados. Os homens que compuseram nossa amostra apresentaram níveis basais de glicose, TG, massa magra, e taxa metabólica basal maiores que as mulheres, enquanto que os níveis de HDL-C foram menores. Estas diferenças já são esperadas com base nas diferenças fisiológicas entre os sexos (PELLEGRINI, *et al.*, 2014).

Tais diferenças alteram tanto a prevalência, quanto o curso e a patofisiologia das doenças associadas a estes fatores metabólicos alterados (fatores de risco), influenciando a eficácia dos procedimentos de prevenção e tratamento das mesmas em

homens e mulheres (DALLONGEVILLE *et al.*, 2004; ARNETZ; EKBERG; ALVARSSON, 2014).

Os níveis plasmáticos de glicose em jejum são naturalmente menores nas mulheres (SZALAT; RAZ, 2008), fazendo com que os fatores alterados em quadros de distúrbios do metabolismo da glicose sejam característicos em cada sexo. A glicemia em jejum alterada é mais comum em homens, enquanto que a alteração da tolerância à glicose é mais frequente entre as mulheres (DALLONGEVILLE *et al.*, 2004; ARNETZ; EKBERG; ALVARSSON, 2014). O perfil lipídico também apresenta diferenças basais entre os sexos (PELLEGRINI *et al.*, 2014). Mulheres pré-menopausa possuem níveis plasmáticos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), muito baixa densidade (VLDL), e triglicerídeos (TG) menores, enquanto que os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL-C) são maiores em comparação aos homens, o que demonstra que nossos achados estão em concordância com a literatura (WILLIAMS, 2004).

As diferenças de gênero quanto à composição corpórea são também bem conhecidas, sendo que os homens apresentam maior quantidade de massa magra que as mulheres, o que acarreta em taxa de metabolismo basal maiores (CUNNINGHAM, 1980), como observado em nossa amostra.

O padrão de distribuição de gordura apresenta dimorfismo sexual bastante conhecido: nos homens o percentual de gordura visceral é maior que nas mulheres, as quais tendem a acumular mais gordura subcutânea. Em nossa amostra observamos que os homens apresentaram tendência estatística ($p=0,086$) a apresentarem maior espessura de gordura visceral, que poderia tornar-se significativa com o aumento do número de homens analisados. Apesar do efeito nocivo que a gordura visceral apresenta, os homens parecem possuir mecanismos metabólicos compensatórios, talvez justamente por conta destas diferenças inerentes ao sexo, pelo menos no que se refere ao papel deste tipo de gordura na gênese do *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2). A associação entre a gordura visceral e DMT2 é maior em mulheres, visto que entre as portadoras desta doença 70% apresentam também gordura visceral aumentada, enquanto que entre os homens com DMT2, 40% apenas apresentaram este distúrbio metabólico associado (PASQUALI *et al.*, 2008).

A influência dos hormônios sexuais frente às diferenças observadas pode ser comprovada pelo fato de que após a menopausa as mulheres tendem a apresentar a obesidade androide (visceral), e aumentar seus níveis de perfil lipídico (HAARBO *et al.*, 1991; REGITZ-ZAGROSEK; LEHMKUHL; WEICKERT, 2006).

Todas estas diferenças discutidas acima fazem com que o *cluster* de distúrbios metabólicos que representam risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica (SMet) possua componentes com pesos diferentes em homens e mulheres pré-menopausa, apesar de alguns estudos não considerarem tais diferenças (GYAWALI *et al.*, 2015; VADIVELOO; PARKEH; MATTEI, 2015). Em homens, os níveis de apolipoproteínas e a hipertensão possuem papel preponderante na etiologia da SMet, enquanto que nas mulheres pré-menopausa o sobrepeso e a obesidade, obesidade visceral, e baixos níveis de HDL-C são os fatores que representam maior contribuição, sendo justamente estes os distúrbios para os quais, em situações de homeostase, as mulheres apresentam proteção (DALLONGEVILLE *et al.*, 2004).

Influência dos polimorfismos nos genes de receptores beta adrenérgicos sobre fatores de risco para a SMet em homens e mulheres

A associação entre os polimorfismos investigados e os fatores que compõem a SMet foi dependente de gênero. A frequência do alelo Glu27, significativamente maior nas mulheres que compuseram nossa amostra comparada à frequência observada nos homens, pode ser devida a eventuais vantagens que esta variante representa em vias metabólicas exclusivamente femininas, sendo assim favorecida por seleção. Entretanto, pode representar uma flutuação ao acaso, decorrente da amostragem e sem importância evolutiva. Estudos com amostras maiores podem elucidar esta questão.

A base funcional subjacente à associação das variantes do gene *ADBR2* investigadas e os componentes isolados da SMet pode estar relacionada à extensão da regulação negativa exercida pelos agonistas ao RA-B2; porém, o efeito das diferenças de gênero frente a esta variação é desconhecida.

GREEN *et al.* (1995) demonstraram que o receptor expressando o tipo selvagem apresentou redução de $26\pm3\%$ na densidade de expressão após 24h de exposição a agonistas, enquanto que o receptor expressando Arg16Gly reduziu $41\pm3\%$, e Gln27Glu mostrou-se completamente resistente à regulação negativa. A combinação Arg16Gly+Gln27Glu também apresentou aumento significativo na regulação negativa ($39\pm3\%$). KORYAKINA *et al.* (2012) confirmaram que estas variantes interferem no processo de dessensibilização dos receptores, apresentando diferenças na eficiência com a qual os receptores ativados pelos agonistas são direcionados aos lisossomos para degradação, ou ainda diferenças no processo de degradação no interior do lisossomo.

Apesar de ser desconhecido o impacto diferencial que estes SNPs podem apresentar em sua funcionalidade frente às diferenças de gênero, é sugerido que as diferenças inerentes ao sexo desempenham papel na influência do genótipo dos receptores adrenérgicos-B2 e a obesidade (SMALL; McGRAW; LIGGETT, 2003). Efeitos contrários do polimorfismo Gln27Glu são descritos em homens e mulheres. Em mulheres obesas o alelo Glu27 em homozigose foi associado com maior quantidade de gordura (ARNER; HOFFSTEDT, 1999); já em outro estudo, a obesidade em homens não foi associada a este alelo, e sim ao alelo Gln27 (HELLSTROM *et al.*, 1999).

Nós constatamos este efeito diferencial de Gln27Glu em homens e mulheres sobre as médias de EMI da artéria carótida. O genótipo heterozigoto conferiu aos homens maior média de EMI comparados aos homozigotos Glu27; enquanto que nas mulheres heterozigotas, comparadas as mulheres Gln27Gln a média deste parâmetro foi menor. Este foi o único efeito observado deste SNP sobre as mulheres que compuseram a amostra, enquanto que nos homens ele foi associado também aos níveis de glicose. No estudo de GONZÁLES-SÁNCHEZ *et al.* (2003) em uma amostra populacional espanhola, resultados bastante semelhantes foram encontrados. O SNP Gln27Glu não influenciou parâmetros associados a DMT2 e obesidade em mulheres, no entanto em homens demonstrou efeito sobre os níveis de glicemia após carga de glicose, IMC e diâmetro abdominal, sugerindo que o SNP em questão é um fator de risco em homens, porém não em mulheres. DALLONGEVILLE *et al.* (2003) também

apontaram associação exclusiva em homens, mas de ambos os SNPs (Arg16Gly e Gln27Glu), com a síndrome metabólica.

Nossos resultados, no entanto, sugerem possível efeito do SNP Arg16Gly sobre o IMC, quantidade de massa magra e níveis de glicemia em jejum nas mulheres. DAGHESTANI e colaboradores (2012) também encontraram associação entre este SNP e fatores associados à SMet e obesidade, porém, não estratificaram a amostra por gênero. O alelo Gly16 foi mais frequente entre os indivíduos obesos ou com sobrepeso, comparados aos indivíduos com IMC normal; e os portadores deste alelo também apresentaram maiores níveis de glicemia. Em nosso estudo, as mulheres portadoras do alelo Gly16 em homozigose apresentaram maior IMC, e maiores níveis de glicose, o que pode indicar papel importante deste alelo sobre os fatores de risco da SMet em mulheres apenas, já que este SNP não apresentou influência sobre os parâmetros observados nos homens que compuseram nossa amostra.

Quanto à associação do SNP Trp64Arg do gene *ADBR3*, os resultados foram restritos aos homens.

Em humanos, o alelo com maior frequência no resíduo 64 do receptor adrenérgico-B3 é o Trp, enquanto que em outras espécies o resíduo predominante parece ser a Arg64, sugerindo que as funções do receptor em espécies distintas podem representar adaptações metabólicas distintas (SMALL; McGRAW; LIGGETT, 2003). O fato de japoneses e esquimós possuírem frequência mais elevada do alelo Arg64, comparado aos caucasianos (ARNER; HOFFSTED, 1999), também sugere que efeitos funcionais distintos são associados a mudança de aminoácido nesta posição, que ocupa o resíduo mais distal dentro do primeiro domínio transmembrana do receptor. No entanto, estudos funcionais adicionais são necessários para elucidar o efeito do polimorfismo Trp64Arg sobre a expressão e afinidade a agonistas do RA-B3.

O efeito do alelo Arg64 do gene *ADBR3* sobre os níveis de HDL-C que observamos nos homens foi semelhante ao encontrado por Brondani *et al.* (2014), que também constataram níveis médios de HDL-C maiores entre os portadores deste alelo comparados aos não portadores (Trp64Trp), também em uma população Euro-Brasileira, porém não estratificada pelo gênero.

A etnia também parece estar relacionada à variação nos resultados de estudos de associação entre este polimorfismo e fatores metabólicos. Mirrakhimov *et al.* (2011) encontraram efeito oposto deste alelo em uma amostra populacional de 213 indivíduos do Quirguistão (Ásia central). Os portadores do alelo Arg64 apresentaram níveis de HDL-C menores comparados aos não portadores. Ao comparar a frequência alélica de Arg64 encontrada em nossa população ($7,51\% \pm 0,00$) com a descrita por Mirrakhimov *et al.* (2011) (23,9%), encontramos diferença significativa ($p=0,00001$), o que possivelmente contribuiu para a divergência de resultados.

A maior espessura médio intimal (EMI) da carótida entre os homens portadores do alelo Arg64 foi semelhante aos achados de Iemitsu *et al.* (2014) que encontraram medidas de EMI maiores entre os portadores (homens e mulheres) do genótipo Arg64Arg com baixo nível de desempenho cardiorrespiratório. Outro estudo, no entanto, não associou este SNP a EMI (MORRISON *et al.*, 1999).

A divergência entre os resultados de estudos de associação destes três SNPs e fatores de risco para a SMet é bastante evidente na literatura. Por se tratarem de características complexas, inúmeras variáveis são envolvidas na determinação do fenótipo, o que por si só agrega grande complexidade nas vias metabólicas subjacentes a estes fatores. Os SNPs em questão contribuem com uma pequena parcela para os fenótipos avaliados, e parecem apresentar um nível a mais de variação exercida pelo gênero.

Diferenças metodológicas, e outras, inerentes às populações estudadas, contribuem para a heterogeneidade de resultados observada. Nosso estudo em específico possui algumas limitações quanto ao tamanho amostral, que podem ter prejudicado a observação de possíveis associações, principalmente após as estratificações por gênero e genótipo. A repetição do estudo em amostras maiores, ou ainda compostas por mulheres pós-menopausa poderia contribuir para o conhecimento acerca das diferenças dos padrões de associação destas variáveis genéticas e componentes da SMet na população Euro-Brasileira.

Em conclusão, podemos sugerir que as variáveis genéticas Arg16Gly e Gln27Gln do gene *ADBR2*, e Trp64Arg do gene *ADBR3* apresentaram associação com alguns

parâmetros de risco para a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares em uma amostra populacional Euro-Brasileira, com variações quanto à contribuição das mesmas em função do gênero.

REFERÊNCIAS

- ARNER, P.; HOFFSTEDT, J. Adrenoceptor genes in human obesity. **J. Intern. Med.** v.245, p.667–72, 1999.
- ARNETZ, L.; EKBERG, N.R.; ALVARSSON, M. Sex differences in type 2 diabetes: focus on disease course and outcomes. **DiabMetabSyndrObes.**, v.7, p.409–420, 2014.
- BACHMAN, E.S.; DHILLON, H.; ZHANG, C.Y.; CINTI, S.; BIANCO, A.C.; KOBILKA, B.K.; LOWELL, B.B. AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. **Science**, v.297, p.843–845, 2002.
- BOYDA, H.N.; PROCYSHYN, R.M.; PANG, C.C.; BARR, A.M. Peripheral adrenoceptors: the impetus behind glucose dysregulation and insulin resistance. **J Neuroendocrinol.**, v.25, p.217-28, 2013.
- BRONDANI, L.A.; DUARTE, G.C.; CANANI, L.H.; CRISPIM, D. The presence of at least three alleles of the ADRB3 Trp64Arg (C/T) and UCP1 -3826A/G polymorphisms is associated with protection to overweight/obesity and with higher high-density lipoprotein cholesterol levels in Caucasian-Brazilian patients with type 2 diabetes. **MetabSyndrRelatDisord.**, v.12, p.16-24, 2014.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev.**, v.84, p.277-359, 2004.
- CLIFFORD, G.M.; LONDOS, C.; KRAEMER, F.B.; VERNON, R.G.; YEAMAN, S.J. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. **J BiolChem**, v. 275, p.5011–5015, 2000.
- COGILL, B. Anthropometric Indicators Measurement Guide. FANTA Publications, 2003
- COLLINS, S.; CAO, W.; ROBIDOUX, J. Learning New Tricks from Old Dogs: β -Adrenergic Receptors Teach New Lessons on Firing Up Adipose Tissue Metabolism. **MolEndocrinol**, v.18, p.2123–2131, 2004.

COLLINS, S.; YEHUDA-SHNAIDMAN, E.; WANG, H. Positive and negative control of Ucp1 gene transcription and the role of b-adrenergic signaling networks. **International Journal of Obesity**, v.34, p. S28–S33, 2010.

CUNNINGHAM JJ. A reanalysis of the factors influencing basal metabolic rate in normal adults. **Am J Clin Nutr**, v.33, p.2372-4, 1980.

DAGHESTANI, M.H.; WARSY, A.; DAGHESTANI, M.H.; AL-ODAIB, A.N.; ELDALI, A.; AL-EISA, N.A.; OMER, S.A.; HASSAN, Z.K. Arginine 16 Glycine Polymorphism in β 2-Adrenergic Receptor Gene is Associated with Obesity, Hyperlipidemia, Hyperleptinemia, and Insulin Resistance in Saudis. **Int J Endocrinol.**, v.2012, 2012.

DALLONGEVILLE, J.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; AMOUYEL, P.; MEIRHAEGHE, A. The Gly16-->Arg16 and Gln27-->Glu27 polymorphisms of beta2-adrenergic receptor are associated with metabolic syndrome in men. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.;88, p.4862-6, 2003.

DALLONGEVILLE, J.; COTTEL, D.; ARVEILER, D.; *et al.* The association of metabolic disorders with the metabolic syndrome is different in men and women. **Ann Nutr Metab.**, v.48, p.43–50, 2004.

ENGELHORN, C. A.; MORAIS FILHO, D.; BARROS, F. S.; COELHO, N. A. Guia Prático de Ultrassonografia Vascular. 2. Dilivros, 2010.

ENOCKSSON, S.; TALBOT, M.; RIFE, F.; TAMBORLANE, W.V.; SHERWIN, R.S.; CAPRIO, S. Impaired in vivo stimulation of lipolysis in adipose tissue by selective beta2-adrenergic agonist in obese adolescent girls. **Diabetes**, v.49, p.2149 – 2153, 2000.

GONZÁLEZ SÁNCHEZ, J.L.; PROENZA, A.M.; MARTÍNEZ LARRAD, M.T.; RAMIS, J.M.; FERNÁNDEZ PÉREZ, C.; PALOU, A.; SERRANO RÍOS, M. The glutamine 27 glutamic acid polymorphism of the beta2-adrenoceptor gene is associated with abdominal obesity and greater risk of impaired glucose tolerance in men but not in women: a population-based study in Spain. **Clin Endocrinol**, v.59, p.476-81, 2003.

GREEN, S.A.; TURKI, J.; HALL, I.P.; LIGGETT, S.B. Implications of genetic variability of human beta 2-adrenergic receptor structure. **Pulm Pharmacol**, v.8, p.1–10, 1995.

GYAWALI, P.; TAKANCHE, J.S.; SHRESTHA, R.K.; BHATTARAI, P.; KHANAL, K.; RISAL, P.; KOJU, R. Pattern of thyroid dysfunction in patients with metabolic syndrome and its relationship with components of metabolic syndrome. **Diabetes Metab J.** v.39, p.66-73, 2015.

HAARBO, J.; MARSLEW, U.; GOTFREDSEN, A.; CHRISTIANSEN, C. Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. **Metabolism**, v.40, p.1323–1326, 1991.

HALLSTRAND, T.S.; FISCHER, M.E.; WURFEL, M.M.; AFARI, N.; BUCHWALD, D.; GOLDBERG, J. Genetic pleiotropy between asthma and obesity in a community-based sample of twins. **J Allergy Clin Immunol.**, v.116, p.1235-41, 2005.

HELLSTROM, L.; LARGE, V.; REYNISDOTTIR, S.; WAHRENBERG, H.; ARNER, P. The different effects of a Gln27Glu β 2- adrenoceptor gene polymorphism on obesity in males and in females. **J. Intern. Med.** v.245, p.253–59, 1999.

HONNOR, R.C.; DHILLON, G.S.; LONDOS, C. cAMP-dependent protein kinase and lipolysis in rat adipocytes. I. Cell preparation, manipulation, and predictability in behavior. **J BiolChem**, v.260, p.15122–15129, 1985.

IEMITSU, M.; FUJIE, S.; MURAKAMI, H.; SANADA, K.; KAWANO, H.; GANDO, Y.; KAWAKAMI, R.; TANAKA, N.; MIYACHI, M. Higher cardiorespiratory fitness attenuates the risk of atherosclerosis associated with ADRB3 Trp64Arg polymorphism. **Eur J Appl Physiol.**, v.114, p.1421-8, 2014.

ISRAEL, E.; DRAZEN, J.M.; LIGGETT, S.B.; BOUSHEY, H.A.; CHERNIACK, R.M.; CHINCHILLI, V.M.; COOPER, D.M.; FAHY, J.V.; FISH, J.E.; FORD, J.G.; KRAFT, M.; KUNSELMAN, S.; *et al.* Effect of polymorphism of the beta-2-adrenergic receptor on response to regular use of albuterol in asthma. **Int. Arch. Allergy Immun.**, v.124, p.183-186, 2001.

KORYAKINA, Y.; JONES, S.M.; CORNETT, L.E.; SEELY, K.; BRENTS, L.; *et al.* Effects of the β -agonist, isoprenaline, on the down-regulation, functional responsiveness and trafficking of β 2-adrenergic receptors with N-terminal polymorphisms. **Cell Biol Int**, v.36, p.1171-83, 2012.

KUMAR, N.; ROBIDOUX, J.; DANIEL, K.W.; GUZMAN, G.; FLOERING, L.M.; COLLINS, S. Requirement of vimentin filament assembly for beta3- adrenergic receptor activation of ERK MAP kinase and lipolysis. **J BiolChem**, v.282, p.9244–9250, 2007.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, JR J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** v.19, p.5444, 1991.

LAI, E.; PETTERSSON, U.; VERDUGO, A.D.; CARLSSON, P.O.; BODIN, B.; KÄLLSKOG, Ö.; PERSSON, A.E.; SANDBERG, M.; JANSSON, L. Blood lipids affect rat islet blood flow regulation through β 3-adrenoceptors. **Am J PhysiolEndocrinolMetab.**, v.307, p.E653-63, 2014.

LIGGETT, S.B.; WAGONER, L.E.; CRAFT, L.L.; HORNING, R.W.; HOIT, B.D.; *et al.* The Ile164 β 2-adrenergic receptor polymorphism adversely affects the outcome of congestive heart failure. **J. Clin. Invest.**, v.102, p.1534–39, 1998.

LORENZ, M. W.; MARKUS, H. S.; BOTS, M. L.; ROSVALL, M.; SITZER, M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. **Circulation**. v. 115, n. 4, p. 459-67, 2007.

MIRRAKHIMOV, A.E.; KERIMKULOVA, A.S.; LUNEGOVA, O.S.; MOLDOKEEVA, C.B.; ZALESSKAYA, Y.V.; ABILOVA, S.S.; SOVHOZOVA, N.A.; ALDASHEV, A.A.; MIRRAKHIMOV, E.M. An association between TRP64ARG polymorphism of the B3 adrenoreceptor gene and some metabolic disturbances. **CardiovascDiabetol**. v.10, p.1-7, 2011.

MO, W.; ZHANG, G.G.; YANG, T.L.; DAI, X.P.; LI, H.H.; ZENG, H.; LIU, J.; TAN, Y.M.; ZHOU, H.H.; LIU, Z.Q. The genetic polymorphisms of beta3-adrenergic receptor (AR) Trp64Arg and beta2-AR Gln27Glu are associated with obesity in Chinese male hypertensive patients. **ClinChem Lab Med**, v.45, p.493-8, 2007.

MORRISON, A.C.; BRANCATI, F.L.; FOLSOM, A.R.; SMITH, L.; BOERWINKLE, E. Beta3-adrenergic receptor Trp64Arg polymorphism does not predict incident CHD or carotid intima-media thickness in a community-based sample of whites: the ARIC study. Atherosclerosis Risk in Communities. **Hum Genet.**, v.105, p.314-9, 1999.

NETO, M.A.; RASCADO, R.R.; BENDHACK, L.M. Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR, 39., 2006, Ribeirão Preto.

PASQUALI, R.; VICENNATI, V.; GAMBINERI, A.; PAGOTTO, U. Sex-dependent role of glucocorticoids and androgens in the pathophysiology of human obesity. **Int J Obes**, v.32, p.1764–1779, 2008.

PELLEGRINI, M.; PALLOTTINI, V.; MARIN, R.; MARINO, M. Role of the sex hormone estrogen in the prevention of lipid disorder. **Curr Med Chem**, v.21, p.2734-42, 2014.

REGITZ-ZAGROSEK, V.; LEHMKUHL, E.; WEICKERT, M.O. Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. **Clin Res Cardiol**, v.95, p.136–147, 2006.

ROBIDOUX, J.; KUMAR, N.; DANIEL, K.W.; MOUKDAR, F.; CYR, M.; MEDVEDEV, A.V.; *et al.* Maximal beta3-adrenergic regulation of lipolysis involves Src and epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. **J BiolChem**, v.281, p.37794–37802, 2006.

RODRIGUES, M.N.; SILVA, S.C.; MONTEIRO, W.D.; FARINATTI, P.T. V. Estimativa da gordura corporal através de equipamentos de bioimpedância, dobras cutâneas e pesagem hidrostática **Rev. Bras. Med. Esporte.** v. 7, p.1517-8692, 2001.

SCHIFFELERS, S.L.; SARIS, W.H.; BOOMSMA, F.; VAN BAAK, M.A. beta(1)- and beta(2)-Adrenoceptor-mediated thermogenesis and lipid utilization in obese and lean men. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.2191 – 2199, 2001.

SMALL, K.M.; MCGRAW, D.; LIGGETT, S.B. Pharmacology and Physiology of Human Adrenergic Receptor Polymorphisms. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.43, p.381–411, 2003.

SZALAT, A.; RAZ, I. Gender-specific care of diabetes mellitus: particular considerations in the management of diabetic women. **Diabetes Obes Metab.**, v.10, p.1135–1156, 2008.

SZENTMIKLOSI, A.J.; SZENTANDRÁSSY, N.; HEGYI, B.; HORVATH, B.; MAGYAR, J.; BÁNYÁSZ, T.; NANASI, P.P. Chemistry, physiology, and pharmacology of β -adrenergic mechanisms in the heart. why are β -blocker antiarrhythmics superior? **Curr Pharm Des.** v.21, p.1030-4, 2015.

TSAI, H.J.; SHAIKH, N.; KHO, J.Y.; BATTLE, N.; NAQVI, M.; NAVARRO, D.; MATAALLANA, H.; LILLY, C.M.; ENG, C.S.; KUMAR, G.; THYNE, S.; WATSON, H.G.; MEADE, K.; LENOIR, M.; CHOUDHRY, S.; BURCHARD, E.G.; STUDY OF AFRICAN AMERICANS, ASTHMA, GENES ENVIRONMENTS (SAGE). Beta-2-adrenergic receptor polymorphisms: pharmacogenetic response to bronchodilator among African American asthmatics. **Hum. Genet.**, v.119, p. 547-557, 2006.

VADIVELLOO, M.; PARKEH, N.; MATTEI, J. Greater Healthful Food Variety as Measured by the US Healthy Food Diversity Index Is Associated with Lower Odds of Metabolic Syndrome and its Components in US Adults. **J Nutr.**, v.145, p.564-71, 2015.

VLACHOS, I. S.; HATZIOANNOU, A.; PERELAS, A.; PERREA, D. N. Sonographic assessment of regional adiposity. **Am J Roentgenol.** v. 189, n. 6, p. 1545-53, 2007.

WILLIAMS CM. Lipid metabolism in women. **Proc Nutr Soc.** v.63, p.153–160, 2004.

CAPÍTULO IV

“ASSOCIAÇÃO DO SNP L72M DA *GHRL* COM OS NÍVEIS DE HDL, E DO SNP rs8994 DE *PLIN4* COM OS NÍVEIS DE LDL-C, CT E TG DEPENDENTE DO GÊNERO”

RESUMO

Os níveis plasmáticos de lipoproteínas são fatores de risco modificáveis para síndrome metabólica (SMet) e doenças cardiovasculares (DCV), daí a importância de se conhecer fatores que influenciam seus níveis para que medidas mais eficazes sejam aplicadas no sentido de prevenção e tratamento de suas alterações. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a influência do polimorfismo Leu72Met (L72M) do gene grelina (*GHRL*), e o polimorfismo rs8889 do gene perilipina 4 (*PLIN4*) com os níveis de glicose e insulina, e lipoproteínas de interesse clínico (HDL-C, LDL-C, TG, CT) em 212 indivíduos aparentemente saudáveis de etnia Euro-Brasileira. O alelo Met72 da *GHRL* foi associado a menores níveis de HDL-C na amostra geral ($p=0,037$). O polimorfismo rs8889 de *PLIN4* apresentou associação dependente do gênero com os níveis de LDL-C, CT e TG, uma vez que as mulheres com genótipo homozigoto menos frequente (AA) apresentaram níveis menores de LDL-C e CT comparadas às homozigotas comuns (GG) ($p=0,04$; $p=0,007$, respectivamente); enquanto que os homens portadores do alelo menos frequente (GA+AA) apresentaram níveis de TG maiores comparados aos não portadores (GG) ($p=0,04$). Estes resultados sugerem que fatores hormonais e fisiológicos inerentes ao sexo podem estar modulando os efeitos do polimorfismo rs8884 de *PLIN4* sobre os níveis de LDL-C e CT; enquanto que o alelo Met72 da *GHRL* pode configurar fator de risco para DCVs e SMet, devido a contribuição do mesmo para o decréscimo dos níveis de HDL-C.

INTRODUÇÃO

Os níveis alterados de lipoproteínas, glicose e insulina plasmáticas são fatores de risco modificáveis para síndrome metabólica (SMet), doenças cardiovasculares (DCV), e diabetes mellitus do tipo 2 (DMT2) (KANNEL *et al.*, 1961; CASTELLI, 1988). Apesar de serem altamente influenciados por fatores ambientais, tais como alimentação e o nível de atividade física (GLOBAL LIPIDS GENETICS CONSORTIUM, 2013), a contribuição genética é bastante importante, uma vez que as estimativas de herdabilidade são altas e variam entre: 20 a 55% (BURKE *et al.*, 1997; MANSON *et al.*, 1991) e 10 a 63% (HONG *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2006) para os níveis de insulina e glicemia em jejum, respectivamente; 25 a 60% para triglicerídeos; 30 a 80% para HDL-C (*high density lipoprotein cholesterol*); 26 a 60% para LDL-C (*low density lipoprotein cholesterol*) e 50 a 60% para CT (*colesterol total*) (PÉRUSSE *et al.*, 1997; WU *et al.*, 2002).

São muitos os genes e suas variantes que contribuem para a variação dos níveis de lipoproteínas. Muitos deles demonstram ter efeito pleiotrópico e por meio de vias metabólicas complexas influenciam também outros fatores de risco para as DCVs e SMet, tais como a pressão sanguínea, IMC e disfunções hepáticas (RANKINEN *et al.*, 2015). Um estudo recente do GLOBAL LIPIDS GENETICS CONSORTIUM (2013) encontrou associação entre 157 *loci* e os níveis de lipídeos sanguíneos.

Os SNPs investigados neste trabalho: Leu72Met (*GHRL*) e rs8887 (*PLIN4*), já foram previamente associados a disfunções metabólicas (KILPELÄINEN *et al.*, 2008; CORELLA *et al.*, 2004) e localizam-se em genes cujos produtos participam de vias do metabolismo energético.

A grelina é um hormônio peptídico presente no estômago (KOJIMA; HOSODA; DATE, 1999), também detectado em quantidades menores em vários outros tecidos (VAN DER LELY *et al.*, 2004). Suas funções incluem a estimulação do apetite e ingestão preferencial de gordura, reguladas por vias hipotalâmicas complexas no centro do apetite, por meio da estimulação do neuropeptídeo Y, das proteínas relacionadas ao apetite (AGRP), ambos orexigênicos, e dos neurônios produtores de orexina

(KORBONITS *et al.*, 2004). Seu gene codificador (*GHLR*) apresenta o polimorfismo rs8887, já associado à obesidade precoce (KORBONITS *et al.*, 2002), a síndrome metabólica (XU *et al.*, 2008), e a alguns dos seus traços (STEINLE *et al.*, 2005).

A perilipina 4 é expressa principalmente nos adipócitos, e realoca os lipídios para a formação de gotículas quando estimuladas com insulina e oleato. Estudos funcionais sugerem que ela facilitaria a absorção de ácidos graxos livres do sangue para o interior das gotículas de estoque de lipídios, em resposta ao estado nutricional da célula (MARINESCU *et al.*, 2005). O gene da perilipina4 (*PLIN4*) possui o SNP rs8887, localizado na sua região 3'UTR, o qual já foi associado a maior adiposidade e interação com fatores dietéticos (RICHARDSON *et al.*, 2011). Além disto, este polimorfismo parece estar em um sítio de ligação para o micro RNA-522 (miR-522) e seu alelo raro pode induzir a redução de até 20% do *PLIN4* expresso (RICHARDSON *et al.*, 2011).

Estudos de associação entre variantes genéticas comuns e níveis de lipoproteínas plasmáticas podem identificar alvos para novas terapias que trarão avanço nos métodos de prevenção e tratamento das DCV (TESLOVICH *et al.*, 2010; BARTER *et al.*, 2012). Contribuindo para este cenário, nosso trabalho investigou a associação das variantes rs696217 (*GHRL*) e rs8887 (*PLIN4*) com as variações nos níveis de parâmetros metabólicos considerados fatores de risco para SMet em uma amostra populacional composta por 213 indivíduos da região Sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi composta por 213 indivíduos saudáveis de descendência Euro-Brasileira, moradores de Curitiba e região, os quais voluntariamente participaram do trabalho. Com o objetivo de selecionarmos uma amostra representativa da heterogeneidade populacional, nenhum critério de exclusão ou inclusão foi adotado. Deste total, 75 são homens (com idades entre 26–59 anos, sendo que 66% deles apresentaram obesidade ou sobrepeso), e 138 são mulheres (com idades entre 25 – 70

anos, sendo que 60,9% delas apresentaram obesidade ou sobrepeso) ($IMC \geq 25$ = sobrepeso; $IMC \geq 30$ = obeso).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (CEP/SD 1159.084.11.06/ CAAE0082.0.091.000-11).

Parâmetros Bioquímicos

As coletas de sangue foram realizadas com os indivíduos em jejum de 8 a 12 horas, e os níveis de glicemia (mg/dL), insulina (μ UI/MI), HDL-C (high-density-lipoprotein) (mg/dL), CT (colesterol total) (mg/dL), TG (triglicerídeos) (mg/dL) e LDL-C (low-density-lipoprotein) (mg/dL) foram obtidos por métodos automatizados.

Investigação dos SNPs

Foram investigados o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) rs696217 do gene grelina (*GHRL*; G>T; Leu72Met) e o SNP rs8887 do gene perilipina 4 (*PLIN4*; G>A), localizado na região 3'UTR do gene.

O DNA foi extraído do sangue periférico total pelo método de salting-out (LAHIRI; NURNBERGER Jr, 1991), e diluído para concentração final de 20ng/ μ L. As genotipagens foram realizadas por meio do ensaio de discriminação alélica *TaqMan*, utilizando o equipamento 7500TM real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as condições: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; e 50 ciclos de 15 segundos a 95°C intercalados por 1 minuto a 62°C.

Análise Estatística

As frequências alélicas e genotípicas dos SNPs foram obtidas por contagem direta, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o teste de χ^2 .

O teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis bioquímicas analisadas. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste t, quando as variáveis eram

paramétricas, e pelo teste de Mann-Whitney, quando as variáveis eram independentes e não paramétricas. As diferenças dentro de cada grupo, e entre os grupos, foram analisadas usando o teste de Kruskal-Wallis.

O valor de probabilidade para os testes comparativos foi considerado significativo quando $p < 0,05$ (5%).

RESULTADOS

Os SNPs investigados encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,7$), e suas frequências alélicas e genotípicas estão demonstradas na Tabela 1.

TABELA 1 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS DOS SNPs L72M DO GENE *GHRL* E DO SNP rs8887 DO GENE *PLIN4*

<i>GHRL</i>		<i>PLIN4</i>	
L72	90,84±0,004	G	53,29±0,01
M72	9,15±0,004	A	46,71±0,01
L72L72 (N=176)	82,63	GG (N=63)	29,58
L72M72 (N=35)	16,43	GA (N=101)	47,42
M72M72 (N=2)	0,94	AA (N=49)	23

Considerando a baixa frequência do alelo M (M72) do gene *GHRL*, analisamos os genótipos heterozigotos (LM; L72M72) e homozigotos raros (MM; M72M72) em conjunto. Os portadores do genótipo homozigoto comum (LL; L72L72) apresentaram maiores níveis médios de HDL-C comparados aos portadores dos genótipos heterozigoto e homozigoto menos frequente agrupados (Tabela 2).

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENTRE OS PORTADORES DO ALELO MENOS FREQUENTE (LM+MM) E NÃO PORTADORES (LL) DO POLIMORFISMO L72M DO GENE *GHRL*

ParâmetrosBioquímicos	<i>GHRL</i>		
	LL (n=176)	LM+MM (n=37)	p
Insulina (μ UI/ml)	10,17 \pm 8,54	7,83 \pm 2,37	0,343
Glicose (mg/dl)	84,71 \pm 17,80	84,40 \pm 8,48	0,301
HDL-C (mg/dl)	50,82\pm13,29	46,16\pm10,53	0,037
LDL-C (mg/dl)	132,13 \pm 32,03	127,67 \pm 31,36	0,441
TG (mg/dl)	130,85 \pm 67,40	132,16 \pm 73,41	0,932
CT (mg/dl)	208,01 \pm 37,12	200,05 \pm 38,10	0,241

Ao estratificarmos as amostras por gênero não verificamos nenhuma associação do SNP L72M da *GHRL*, com os parâmetros bioquímicos em homens e mulheres separadamente ($p>0,05$).

Já o polimorfismo rs8887 do gene *PLIN4* não apresentou influência sobre as variáveis bioquímicas na amostra geral ($p>0,05$); no entanto, ao estratificarmos as amostras por gênero observamos resultados significativos.

Comparando as médias dos parâmetros analisados entre os portadores dos três possíveis genótipos do rs8887 de *PLIN4* (GG, GA, AA), encontramos resultados significativos apenas entre as mulheres. As portadoras do genótipo homozigoto menos frequente (AA) apresentaram menores níveis médios de LDL-C ($p=0,049$) e CT ($p=0,007$), comparadas às portadoras do alelo comum em homozigose (GG), como mostra a Tabela 3.

TABELA 3 – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS MÉDIOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENTRE OS PORTADORES DOS TRÊS POSSÍVEIS GENÓTIPOS DE *PLIN4* (rs8887) EM HOMENS E MULHERES

Parâmetros Bioquímicos	<i>PLIN4</i>									
	Homens					Mulheres				
	GG ^A (n=24)	GA ^B (n=33)	AA ^C (n=18)	Comparações	p	GG ^A (n=39)	GA ^B (n=68)	AA ^C (n=31)	Comparações	p
Insulina (μUI/MI)	8,09±3,19	10,13±6,07	8,38±2,81	AXB	0,436	8,20±3,10	10,08±8,21	12,81±14,30	AXB	0,655
				BXC	0,699				BXC	0,231
				AXC	0,966				AXC	0,117
Glicose (mg/dl)	86,83±9,92	85,93±9,38	84,38±8,08	AXB	0,759	87,28±29,36	83,03±15,01	82,03±10,33	AXB	0,614
				BXC	0,715				BXC	0,717
				AXC	0,620				AXC	0,344
HDL-C (mg/dl)	44,29±9,97	45,24±9,42	41,28±4,92	AXB	0,846	55,46±13,38	52,25±13,41	52,84±14,71	AXB	0,186
				BXC	0,086				BXC	0,985
				AXC	0,322				AXC	0,350
LDL-C (mg/dl)	130,23±25,70	136,52±34,63	137,80±34,25	AXB	0,456	137,08±33,78	128,18±33,69	122,73±23,62	AXB	0,192
				BXC	0,900				BXC	0,418
				AXC	0,418				AXC	0,049
TG (mg/dl)	131,79±57,49	147,18±81,14	183,17±92,19	AXB	0,771	133,54±64,47	118,01±61,07	108,71±46,70	AXB	0,143
				BXC	0,081				BXC	0,792
				AXC	0,062				AXC	0,083
CT (mg/dl)	200,58±28,63	211,24±37,41	212,83±39,50	AXB	0,248	218,61±38,51	203,94±38,19	193,61±36,49	AXB	0,059
				BXC	0,887				BXC	0,209
				AXC	0,250				AXC	0,007

NOTA: A corresponde ao genótipo GG, B ao genótipo GA, e C ao genótipo AA.

Analizamos também os genótipos de forma agrupada, avaliando se os parâmetros bioquímicos sofreriam influência do polimorfismo de *PLIN4* seguindo um modo de herança recessivo ou dominante. Avaliando o modelo recessivo (homozigoto comum agrupado com heterozigoto *versus* homozigoto menos frequente), verificamos que os níveis de TG foram significativamente maiores ($p=0,044$) entre os homens portadores do genótipo homozigoto menos frequente (AA) (Tabela 4). Entre as mulheres, o efeito do genótipo homozigoto raro (AA) foi o oposto sobre os níveis de CT, conferindo as suas portadoras menores níveis.

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS MÉDIOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENTRE OS HOMOZIGOTOS MENOS FREQUENTES (AA) COMPARADOS AOS HOMOZIGOTOS COMUNS E HETEROZIGOTOS AGRUPADOS (GG+GA) DO rs8887 DE *PLIN4* EM HOMENS E MULHERES

Parâmetros Bioquímicos	PLIN4					
	Homens			Mulheres		
	GG + GA(n=57)	AA(n=18)	p	GG + GA (n=107)	AA(n=31)	p
Insulina ($\mu\text{UI}/\text{ml}$)	9.37 \pm 5.21	8.38 \pm 2.81	0.770	9.41 \pm 6.87	12.82 \pm 14.30	0.135
Glicose (mg/dl)	86.32 \pm 9.54	84.39 \pm 8.08	0.633	84.58 \pm 21.35	82.03 \pm 10.33	0.512
HDL-C(mg/dl)	44.84 \pm 9.58	41.28 \pm 4.92	0.117	53.42 \pm 13.42	52.83 \pm 14.71	0.698
LDL-C(mg/dl)	133.88 \pm 31.09	137.80 \pm 34.25	0.650	131.42 \pm 33.84	122.73 \pm 23.62	0.183
TG (mg/dl)	140.70 \pm 71.96	183.16 \pm 92.19	0.044	123.67 \pm 62.48	108.71 \pm 46.70	0.353
CT(mg/dl)	206.75 \pm 34.13	212.83 \pm 39.50	0.528	209.29 \pm 38.78	193.61 \pm 36.49	0.047

Avaliando o comportamento dos níveis dos parâmetros bioquímicos segundo o modo de herança dominante (homozigoto comum *versus* portador do alelo menos frequente), verificamos efeito somente entre as mulheres. As portadoras do alelo menos frequente (A) apresentaram níveis menores de CT, comparadas às portadoras do genótipo homozigoto comum (GG), como apresentado na Tabela 5.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS MÉDIOS DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENTRE OS PORTADORES DO ALELO MENOS FREQUENTE (GA+AA) COMPARADOS AOS HOMOZIGOTOS COMUNS (GG) do rs8887 DE *PLIN4* EM HOMENS E MULHERES

Parâmetros Bioquímicos	<i>PLIN 4</i>					
	Homens			Mulheres		
	GG (n=24)	GA+AA(n=51)	p	GG (n=39)	GA+AA(n=99)	p
Insulina(μ UI/MI)	8.09 \pm 3.19	9.68 \pm 5.42	0.563	8.21 \pm 3.11	10.95 \pm 10.50	0.337
Glicose(mg/dl)	86.83 \pm 9.92	85.39 \pm 8.90	0.658	87.28 \pm 29.36	82.72 \pm 13.67	0.454
HDL-C(mg/dl)	44.29 \pm 9.97	43.84 \pm 8.28	0.763	55.46 \pm 13.38	52.43 \pm 13.76	0.179
LDL-C(mg/dl)	130.23 \pm 25.70	136.97 \pm 34.16	0.394	137.08 \pm 33.78	126.47 \pm 30.87	0.079
TG(mg/dl)	131.79 \pm 57.49	159.88 \pm 86.05	0.296	133.54 \pm 64.47	115.10 \pm 56.89	0.077
CT(mg/dl)	200.58 \pm 28.63	211.80 \pm 37.78	0.201	218.61\pm35.51	200.70\pm37.79	0.014

DISCUSSÃO

Nosso estudo avaliou a influência de dois polimorfismos (L72M e rs8887) em dois genes (*GHRL* e *PLIN4*, respectivamente) já previamente associados com distúrbios metabólicos considerados fatores de risco para a SMet e DCV (RICHARDSON *et al.*, 2011; LIAO *et al.*, 2013; HEDAYATIZADEH-OMRAN *et al.*, 2015). Padrões de associação diferenciados entre estes polimorfismos e os níveis plasmáticos de HDL-C, LDL-C e CT foram observados.

O SNP L7M do gene *GHRL* não mostrou efeito dependente do gênero sobre os níveis de HDL-C. Nossos resultados foram semelhantes aos que Hubáček *et al.* (2007) encontraram em uma amostra composta por 2.559 indivíduos da população Tcheca. Os portadores do alelo Met72 apresentaram níveis de HDL-C menores (-2,3 mg/dL em média; $p=0,01$) comparados aos homozigotos Leu72Leu. Da mesma forma, observamos que os portadores do alelo Met72 apresentaram níveis menores de HDL comparados aos não portadores, porém com diferença maior (-4,66 mg/dL em média). Choi *et al.* (2006) também encontraram níveis plasmáticos significativamente menores de HDL-C (-2,0mg/dL em média) entre os portadores do alelo Met72, em uma amostra de 636 Coreanos não diabéticos.

O HDL-C é uma importante lipoproteína de proteção, cuja base do efeito antiaterogênico consiste no transporte reverso que o mesmo faz do colesterol (KONTUSK; CHAPMAN, 2006) carregando-o das células periféricas para o fígado e outros tecidos que necessitem deste lipídio (BRUCE; CHOUINARD; TALL, 1998). A quantidade de colesterol transportada pelo HDL é mensurada como a quantidade de HDL colesterol (HDL-C), sendo que o aumento de 1mg/dL de HDL-C é associado à diminuição de 2% do risco de DCV em homens e 3% em mulheres (WILSON, 1990; LINSEL-NITSCHKE; TALL, 2005). Atividades anti-inflamatórias e antioxidantes, devido à associação do HDL com enzimas antioxidativas, são também descritas (BOES *et al.*, 2009) .

Considerando o efeito benéfico que o HDL-C desempenha para a homeostase e a proteção que níveis elevados desta lipoproteína representam para as DCVs, o alelo Met72 do gene *GHRL* pode ser considerado um fator de risco, segundo demonstram os nossos resultados e outros disponíveis na literatura (CHOI *et al.* 2006; HUBÁCEK *et al.*, 2007).

Outros SNPs no gene grelina demonstraram efeito sobre os níveis de HDL-C (CHOI *et al.*, 2006; MARTIN; LOREDO; SUN, 2008), porém estes parecem ser independentes um do outro (BOES *et al.*, 2009). Os níveis plasmáticos de grelina e HDL-C já foram positivamente correlacionados (POYKKO *et al.*, 2003; PURNELL *et al.* , 2003) e uma possível interação entre eles já foi sugerida. Beumont *et al.* (2003) observou que formas imobilizadas da grelina se ligam a frações de HDL, o que sugere que partículas HDL podem atuar no transporte da grelina (PURNELL *et al.*, 2003). Estudos futuros são necessários para a compreensão do papel funcional dos polimorfismos da *GHRL* sobre os níveis de HDL-C plasmáticos.

O outro polimorfismo investigado (rs8887 de *PLIN4*) demonstrou efeito diferencial em homens e mulheres. A comparação aos pares dos três possíveis genótipos do SNP revelou um possível efeito aditivo do alelo G no aumento dos níveis de LDL-C e CT em mulheres. Portadoras do genótipo GG apresentaram níveis elevados destas lipoproteínas comparadas as portadoras do genótipo AA, enquanto que as heterozigotas (GA) apresentaram níveis intermediários. A análise estratificada por genótipos agrupados demonstrou que quando unimos as

heterozigotas e as homozigotas comuns (GA+GG), o genótipo heterozigoto fez com que a média dos níveis de CT diminuísse comparativamente às médias exibidas pelas portadoras do genótipo GG isoladamente (Tabela 4). Ao passo que ao agrupar heterozigotas e homozigotas menos comuns (GA+AA), o genótipo heterozigoto influenciou o aumento dos níveis de CT com relação ao nível médio observado entre as portadoras do genótipo mais raro (AA) (Tabela 5).

O efeito do SNP sobre os níveis de triglicerídeos nos homens parece ser recessivo, já que os portadores do genótipo AA apresentaram níveis de TG significativamente maiores que os portadores do genótipo homozigoto comum e heterozigotos agrupados (GG+GA).

Variantes comuns do *locus PLIN* foram associadas a características ligadas a obesidade, níveis de lipoproteínas, e respostas diferenciais a programas de intervenção nutricional e físico, sendo que alguns demonstraram que estas variantes apresentam associação exclusiva em mulheres (QI *et al.*, 2004a; Qi *et al.*, 2004b; QI *et al.*, 2005). Estes resultados indicam uma possível sensibilidade maior entre o gênero feminino quanto à associação de SNPs do *locus PLIN* e variáveis metabólicas e antropométricas associadas à obesidade (ORDOVÁS, 2007). A PLIN1 é o membro mais bem caracterizado da família das perilipinas (SMITH; ORDOVÁS, 2012), enquanto que estudos moleculares e de associação dos polimorfismos de *PLIN4* são mais escassos.

Estudos funcionais sugerem que PLIN4 atuaria na síntese de triglicerídeos (WOLINS *et al.*, 2003). Richardson *et al.* (2011) associou o alelo raro (A) do polimorfismo rs8887 com o aumento da adiposidade, e menor expressão de *PLIN4*, devido a criação de um sítio de ligação do miRNA 522. Porém, os mecanismos que levariam ao aumento da adiposidade em decorrência da diminuição de PLIN4 são desconhecidos (SMITH; ORDOVÁS, 2012).

Da mesma forma, desconhecemos se há ligação entre o possível decréscimo nos níveis de *PLIN4* expressos (devido à presença do alelo A no SNP rs8887), e a diminuição dos níveis plasmáticos de LDL-C e CT entre as mulheres, e aumento dos níveis de TG entre os homens que compuseram nosso estudo. O SNP poderia estar atuando de forma independente sobre os níveis de PLIN4 e os

níveis das lipoproteínas, no entanto são necessários estudos funcionais para elucidar estas especulações.

Como restrições do nosso estudo citamos a amostra relativamente pequena, o que pode ter contribuído para a não detecção de outras associações importantes, e a ausência da replicação dos testes em uma amostra livre das influências dos hormônios sexuais mais significativos. Isto poderia ajudar a entender melhor os padrões de associação em função do sexo observados em nossos resultados.

Sugerimos, com base em nossos achados, conclusões diferentes envolvendo os polimorfismos investigados. O alelo Met72 do gene *GRHL* pode representar risco para a diminuição dos níveis plasmáticos de HDL-C, e consequentemente ter importância na prevenção das DCVs. Já o polimorfismo rs8887 do gene *PLIN4* pode estar associado a efeitos dependentes de gênero, uma vez que entre as mulheres exerceu influência sobre os níveis de LDL-C e CT; enquanto que entre os homens seu efeito foi observado sobre os níveis de TG.

REFERÊNCIAS

BARTER, P.J.; RYE, K.A. Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition as a strategy to reduce cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, v.53, p.1755-66, 2012.

BEAUMONT, N.J.; SKINNER, V.O.; TAN, T.M.; RAMESH, B.S.; BYRNE, D.J.; MACCOLL, G.S.; KEEN, J.N.; BOULOUX, P.M.; MIKHAILIDIS, D.P.; BRUCKDORFER, K.R.; VANDERPUMP, M.P.; SRAI, K.S. Ghrelin can bind to a species of high density lipoprotein associated with paraoxonase. **J Biol Chem**, v. 278, p.8877– 8880, 2003.

BOES, E.; COASSIN, S.; KOLLERITS, B.; HEID, I.M.; KRONENBERG, F. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review. **Exp Gerontol.**, v.44, p.136-60, 2009.

BRUCE, C.; CHOUINARD, R.A. JR.; TALL, A.R. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. **Annu Rev Nutr.**, v.18, p.297-330, 1998.

BURKE, G.L.; SAVAGE, P.J.; SPRAFKA, J.M.; SELBY, J.V.; JACOBS, D.R. JR.; PERKINS, L.L.; ROSEMAN, J.M.; HUGHES, G.H.; FABSITZ, R.R. Relation of risk

factor levels in young adulthood to parental history of disease. The CARDIA study. **Circulation.**, v.84, p.1176–1187, 1991.

CASTELLI, W.P. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. **Canadian Journal of Cardiology.**, v.4(Suppl A):5A–10, 1988.

CHOI, H.J.; CHO, Y.M.; MOON, M.K.; CHOI, H.H.; SHIN, H.D.; JANG, H.C.; KIM, S.Y.; LEE, H.K.; PARK, K.S. Polymorphisms in the ghrelin gene are associated with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2 diabetes mellitus in Koreans. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.91, p.4657-63, 2006.

CORELLA, D.; QI, L.; SORLÍ, J.V.; GODOY, D.; PORTOLÉS, O.; COLTELL, O.; GREENBERG, A.S.; ORDOVAS, J.M. Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, p.5121-6, 2005.

GLOBAL LIPIDS GENETICS CONSORTIUM. Discovery and refinement of loci associated with lipid levels. **Nature Genetics**, v.45, p.1274–1283, 2013.

HEDAYATIZADEH-OMRAN, A.; RAFIEI, A.; KHAJAVI, R.; ALIZADEH-NAVAEI, R.; MOKHBERI, V.; MORADZADEH, K. Association between ghrelin gene (Leu72Met) polymorphism and ghrelin serum level with coronary artery diseases. **DNA Cell Biol.**, v.33, p.95-101, 2014.

HONG, Y.; WEISNAGEL, S.J.; RICE, T.; SUN, G.; MANDEL, S.A.; GU, C.; RANKINEN, T.; GAGNON, J.; LEON, A.S.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; BERGMAN, R.N.; BOUCHARD, C.; RAO, D.C.; HERITAGE FAMILY STUDY. Familial resemblance for glucose and insulin metabolism indices derived from an intravenous glucose tolerance test in Blacks and Whites of the HERITAGE Family Study. **Clin Genet.**, v.60, p.22–30, 2001.

HUBÁČEK, J.A.; BOHUSLAVOVÁ, R.; SKODOVÁ, Z.; ADÁMKOVÁ, V. Variants within the ghrelin gene--association with HDL-cholesterol, but not with body mass index. **Folia Biol (Praha)**, v.53, p.202-6, 2007.

KANNEL, W.B.; DAWBER, T.R.; KAGAN, A.; REVOTSKIE, N.; STOKES, J. Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. **Annals of Internal Medicine.**, v.55, p.33–50, 1961.

KILPELÄINEN, T.O.; LAKKA, T.A.; LAAKSONEN, D.E.; MAGER, U.; SALOPURO, T.; KUBASZEK, A.; TODOROVA, B.; LAUKKANEN, O.; LINDSTRÖM, J.; ERIKSSON, J.G.; *et al.* Interaction of single nucleotide polymorphisms in ADRB2, ADRB3, TNF, IL6, IGF1R, LIPC, LEPR, and GHRL with physical activity on the risk of type 2 diabetes mellitus and changes in characteristics of the metabolic

syndrome: The Finnish Diabetes Prevention Study. **Metabolism**, v.57, p.428-36, 2008.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v.402, p.656-660, 1999.

KONTUSH, A.; CHAPMAN, M.J. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. **Pharmacol Rev.**, v.58, p.342-74, 2006.

KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D.C.; *et al.* A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J ClinEndocrMetab**, v.87, p.4005-4008, 2002.

KORBONITS, M.; GOLDSTONE, A.P.; GUEORGUIEV, M.; GROSSMAN, A.B. Ghrelin—a hormone with multiple functions. **Front Neuroendocrinol**, v.25, p.27–68, 2004.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, JR J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** v.19, p.5444, 1991.

LIAO, N.; XIE, Z.K.; HUANG, J.; XIE, Z.F. Association between the ghrelin Leu72Met polymorphism and type 2 diabetes risk: a meta-analysis. **Gene**, v.517, p.179-83, 2013.

LINSEL-NITSCHKE, P.; TALL, A.R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nat Rev Drug Discov.**, v.4, p.193-205, 2005.

MANSON, J.E.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J.; WILLETT, W.C.; KROLEWSKI, A.S.; ROSNER, B.; ARKY, R.A.; SPEIZER, F.E.; HENNEKENS, C.H. A prospective study of maturity-onset DIABETES MELLITUS and risk of coronary heart disease and stroke in women. **Arch Intern Med.**, v.151, p.1141–1147, 1991.

MARINESCU, V.D.; KOHANE, I.S.; RIVA, A. MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. **BMC Bioinformatics**, v.6, p.79, 2005.

MARTIN, G.R.; LOREDO, J.C.; SUN, G. Lack of association of ghrelin precursor gene variants and percentage body fat or serum lipid profiles. **Obesity**, v.16, p.908–912, 2008.

ORDOVÁS, J.M. Gender, a Significant Factor in the Cross Talk Between Genes, Environment, and Health. **Gender Med.** v.4, suppl. B, 2007.

PÉRUSSE, L.; RICE, T.; DESPRÉS, J.P.; BERGERON, J.; PROVINCE, M.A.; GAGNON, J.; LEON, A.S.; RAO, D.C.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; BOUCHARD, C. Familial resemblance of plasma lipids, lipoproteins and postheparin lipoprotein and hepatic lipases in the HERITAGE Family Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.17, p.3263–3269, 1997.

POYKKO, S.M.; KELLOKOSKI, E.; HORKKO, S.; KAUMA, H.; KESANIEMI, Y.A.; UKKOLA, O. Low plasma ghrelin is associated with insulin resistance, hypertension, and the prevalence of type 2 diabetes. **Diabetes**, v.52, p.2546 – 2553, 2003.

PURNELL, J.Q.; WEIGLE, D.S.; BREEN, P.; CUMMINGS, D.E. Ghrelin levels correlate with insulin levels, insulin resistance, and high-density lipoprotein cholesterol but not with gender, menopausal status, or cortisol levels in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, p.5747–5752, 2003.

QI, L.; CORELLA, D.; SORLI, J.V.; PORTOLÉS, O.; SHEN, H.; COLTELL, O.; GODOY, D.; GREENBERG, A.S.; ORDOVAS, J.M. Genetic variation at the perilipin (PLIN) locus is associated with obesity-related phenotypes in white women. **Clin Genet.**, v.66, p.299-310, 2004a.

QI, L.; SHEN, H.; LARSON, I.; SCHAEFER, E.J.; GREENBERG, A.S.; TREGOUET, D.A.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J.M. Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population. **Obes Res.**, v.12, p.1758-1765, 2004b.

QI, L.; TAI, E.S.; TAN, C.E.; TAN, C.E.; SHEN, H.; CHEW, S.K.; GREENBERG, A.S.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J.M. Intragenic linkage disequilibrium structure of the human perilipin gene (PLIN) and haplotype association with increased obesity risk in a multiethnic Asian population. **J Mol Med.**, v.83, p.448-456, 2005.

RANKINEN, T.; SARZYNSKI, M.A.; GHOSH, S.; BOUCHARD, C. Are There Genetic Paths Common to Obesity, Cardiovascular Disease Outcomes, and Cardiovascular Risk Factors? **Circ Res**.v.116, p.909-922, 2015.

RICHARDSON, K.; LOUIE-GAO, Q.; ARNETT, D.K.; PARNELL, L.D.; LAI, C.Q.; DAVALOS, A.; FOX, C.S.; DEMISSIE, S.; CUPPLES, L.A.; FERNANDEZ-HERNANDO, C.; ORDOVAS, J.M. The PLIN4 variant rs8887 modulates obesity related phenotypes in humans through creation of a novel miR-522 seed site. **PLOS One.**, v.20, e17944, 2011.

SANTOS, R.L.; ZILLIKENS, M.C.; RIVADENEIRA, F.R.; POLS, H.A.; OOSTRA, B.A.; VAN DUIJN, C.M.; AULCHENKO, Y.S. Heritability of fasting glucose levels in a young genetically isolated population. **Diabetologia**, v.49, p.667–672, 2006.

SMITH, C.E.; ORDOVÁS, J.M. Update on perilipin polymorphisms and obesity. **Nutr Rev.**, v.706, p.11-21, 2012.

STEINLE, N.I.; POLLIN, T.I.; O'CONNELL, J.R.; MITCHELL, B.D.; SHULDINER, A.R. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the old order amish. **J ClinEndocrinolMetab**, v.90, p.6672–6677, 2005.

TESLOVICH, T.M.; MUSUNURU, K.; SMITH, A.V.; EDMONDSON, A.C.; STYLIANOU, I.M.; KOSEKI, M.; PIRRUCCELLO, J.P.; RIPATTI, S.; CHASMAN, D.I.; WILLER, C.J.; *et al.* Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. **Nature**, v.466, p.707–13, 2010.

VAN DER LELY, A.F.; TSCHOP, M.; HEIMAN, M.L.; GHIGO, E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. **Endocrine Reviews**, v. 25, p.426–457, 2004.

WILSON, P.W. High-density lipoprotein, low-density lipoprotein and coronary artery disease. **Am J Cardiol.**, v.66, p.7A-10A, 1990.

WOLINS, N.E.; SKINNER, J.R.; SCHOENFISH, M.J.; TZEKOV, A.; BENSCH, K.G.; BICKEL, P.E.. Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets. **J Biol Chem.**, v.278, p.37713–37721, 2003.

WU, K.D.; HSIAO, C.F.; HO, L.T.; SHEU, W.H.; PEI, D.; CHUANG, L.M.; CURB, D.; CHEN, Y.D.; TSAI, H.J.; DZAU, V.J.; COX, D.; TAI, T.Y. Clustering and heritability of insulin resistance in Chinese and Japanese hypertensive families: a Stanford-Asian Pacific Program in Hypertension and Insulin Resistance sibling study. **Hypertens Res.** V.25, p.529–536, 2002.

XU, L.L.; XIANG, H.D.; QIU, C.C; XU, Q. Association of ghrelin polymorphisms with metabolic syndrome in Han Nationality Chinese. **Biomed Environ Sci**, v.21, p. 188–192, 2008.

5 DISCUSSÃO GERAL

Devido à forma como este trabalho foi delineado, não foi possível investigar a associação de variantes genéticas e a síndrome metabólica como um todo. Não contamos com uma amostra de portadores da síndrome e uma amostra controle, a fim de se estabelecer relações de causa entre as variáveis e a doença. Entre as nossas amostras, alguns indivíduos apresentaram a síndrome, porém, não em número suficiente para que a estratificássemos com base neste critério.

No entanto, trabalhamos com uma amostra populacional, representativa da heterogeneidade natural de fatores antropométricos e bioquímicos, independente do acometimento de doenças específicas. Isto possibilitou analisar a associação de variantes genéticas frequentes com os componentes isolados da SMet, o que revelou interações presentes na população em geral, que possivelmente contribuem para o desequilíbrio dos mecanismos metabólicos subjacentes à síndrome.

Por se tratarem de características complexas - hábitos alimentares, padrões de atividade física, condições sociais e psicológicas - que não foram consideradas no estudo, certamente contribuíram para os padrões antropométricos, bioquímicos e de imagem observados. Porém, focamos no efeito independente das variantes genéticas, procurando avaliar o impacto independente que as mesmas possuem para o fenótipo observado. Esta abordagem agrega conhecimento à área, porém, o viés introduzido pela falta das outras variáveis, que contribuem para a característica observada, faz com que as comparações e as extrapolações de resultados sejam realizadas com cautela, uma vez que contextos específicos podem trazer interações ainda desconhecidas que alterem os padrões de associação gene-parâmetros observados.

Dentre os fatores que podem alterar as relações de associação entre as variáveis genéticas e os fatores isolados da SMet, encontramos o papel preponderante do gênero em nossos resultados. Foram verificadas associações

dependentes do gênero e também efeitos diferentes do mesmo genótipo sobre os parâmetros observados em homens e mulheres. Variações desta natureza, em função do gênero, são descritas em alguns estudos, mas seus resultados são muito restritos ao contexto experimental abordado. Contudo, a maioria dos estudos de associação entre variantes genéticas e distúrbios metabólicos não introduz a variável gênero em suas análises, o que pode levar a resultados controversos, ou ainda superficiais, os quais não foram capazes de identificar as associações exclusivas em um sexo ou outro.

O estrogênio e a testosterona já foram identificados como fatores regulatórios transcricionais e pós-transcricionais de genes cujos produtos participam do metabolismo energético (HOMMA *et al.*, 2000; NISHIZAWA *et al.*, 2002). A enzima 11 β -HSD1, cujo gene codificador foi abordado neste estudo, demonstrou expressão e atividade aumentada em mulheres pós-menopausa (ANDERSSON *et al.*, 2009). Enquanto que a adiponectina, também contemplada neste trabalho, demonstrou ser estimulada por estrogênio e inibida por testosterona (HALUZÍK; PAŘÍZKOVÁ; HALUZÍK, 2004). Além dos hormônios sexuais atuarem na modulação do metabolismo através da regulação gênica, eles podem trabalhar também em um nível indireto, como acontece, por exemplo, com o dimorfismo sexual da distribuição de gordura corpórea, altamente influenciado por estes hormônios. Neste contexto, os diferentes depósitos de gordura já instalados desempenham papéis endócrinos distintos, sendo que a gordura visceral (característica dos homens) representa risco para DCV e diabetes, enquanto que a glúteofemoral (característica das mulheres) é associada com melhores perfis metabólicos e cardiovasculares (YUSUF *et al.*, 2005).

As diferenças de suscetibilidade e curso da SMet inerentes ao gênero podem também estar sendo mediadas pelos efeitos diferenciados de polimorfismos genéticos frente a diferenças hormonais e fisiológicas em homens e mulheres. Devido à restrição na interpretação de resultados, estudos moleculares *in vitro*, avaliando o impacto das variantes genéticas nas vias metabólicas das quais participam, frente à estimulação por hormônios sexuais, poderia esclarecer a base funcional das diferenças observadas nos estudos de associação das variantes

genéticas e parâmetros metabólicos entre homens e mulheres. Outra abordagem que poderia ser eficiente para os esclarecimentos acerca deste comportamento, seria a comparação dos efeitos específicos destes polimorfismos em variáveis representativas do metabolismo em amostras livres de influência hormonal significativa *versus* amostras compostas por indivíduos em idade reprodutiva. Tais estudos são sugeridos como possíveis formas de se alcançar uma compreensão maior acerca dos achados no presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

- a) O polimorfismo 276G>T do gene *ADIPOQ* apresentou associação com os níveis de adiponectina e com os níveis de CT e LDL-C exclusivamente em homens, sendo que o efeito sobre a adipocina e lipoproteínas foi independente.
- b) O polimorfismo rs846910 do gene *HSD11B1* apresentou associação com os níveis HDL-C, enquanto que o polimorfismo rs12086634 do mesmo gene foi associado aos níveis de glicose. Ambos os resultados foram observados somente entre as mulheres.
- c) O polimorfismo Arg16Arg do gene *ADBR2* foi associado aos níveis de glicose, massa magra, e IMC apenas entre as mulheres. O polimorfismo Gln27Glu do gene *ADBR2* foi associado aos níveis de glicose somente em homens, e a espessura médio intimal da carótida em ambos os sexos. O polimorfismo Trp64Trp do gene *ADBR3* foi associado aos níveis de HDL-C e a espessura médio intimal da carótida somente em homens.
- d) O polimorfismo L72M do gene *GHRL* não apresentou associação dependente de gênero, sendo associado aos níveis de HDL-C na amostra geral.
- e) O polimorfismo rs8887 do gene *PLIN4* apresentou associação com os níveis de LDL-C e CT apenas nas mulheres, e com os níveis de TG apenas entre os homens.
- f) De forma geral, concluímos que as associações entre os polimorfismos investigados e os parâmetros de risco para a síndrome metabólica analisados neste trabalho foram marcadamente dependentes do gênero, com exceção do polimorfismo Leu72Met do gene *GHRL*. Estudos funcionais avaliando o efeito dos hormônios sexuais, bem como estudos de associação com amostras livres da influência significativa de hormônios sexuais são necessários para elucidar estas relações.

REFERÊNCIAS

- ABEL, E.D.; LITWIN, S.E.; SWEENEY, G. Cardiac remodeling in obesity. **Physiol.Rev**, v.88, p.389–419, 2008.
- ADAMCZAK, M.; WIECEK, A.; FUNAHASHI, T.; CHUDEK, J.; KOKOT, F.; MATSUZAWA, Y. Decreased plasma adiponectin concentration in patients with essential hypertension. **Am J Hypertens**, v.16, p.72–75, 2003.
- ALBERTI, K.G.; ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z.; CLEEMAN, J.I.; DONATO, K.A.; FRUCHAR, J.C.; JAMES, W.P.; LORIA, C.M.; SMITH, S.C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640-1645, 2009.
- ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Med**, v. 15, p.539–553, 1998.
- ALBU, J.; KONNARIDES, C.; PI-SUNIYER, F.X. Weight control: metabolic and cardiovascular effects. **Diabetes**.V.3, p.335–347, 1995.
- AL-DAGHRI, N.M.; AL-ATTAS, O.S.; ALOKAIL, M.S.; ALKHARFY, K.M.; HUSSAIN, T.; YAKOUT, S.; VINODSON, B.; SABICO, S. Adiponectin gene polymorphisms (T45G and G276T), adiponectin levels and risk for metabolic diseases in an Arab population. **Gene**, v.493, p.142–147, 2012.
- ALONSO-MAGDALENA, P.; QUESADA, I.; NADAL, A. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, p. 346-353, 2011.
- AL-SHAER, M.; ABUSABHA, H. The impact of ethnicity on the lifetime risk of the metabolic syndrome and diabetes mellitus. **Am J Cardiology**, v.95, p.819–820, 2005.
- ANDERSSON T, SIMONYTE K, ANDREW R, STRAND M, BURÉN J.; *et al*. Tissue-specific increases in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in normal weight postmenopausal women. **PLOS ONE**, v.4, p.1-8, 2009.
- ANDREADIS, E. A.; TSOUROUS, G.I.; TZAVARA, C.K.; GEORGIOPOULOS, D.X.; KATSANOU, P.M.; MARAKOMICHELAKIS, G.E.; DIAMANTOPOULOS, E.J. Metabolic syndrome and incident cardiovascular morbidity and mortality in a Mediterranean hypertensive population. **Am J Hypertens**, v. 20, p. 558–564, 2007.

ARIKOGLU, H.; OZDEMIR, H.; KAYA, D.E.; IPEKCI, S.H.; ARSLAN, A.; KAYIS, S.A.; GONEN, M.S. The Adiponectin variants contribute to the genetic background of type 2 diabetes in Turkish population. **Gene**, v.534, p.10-16, 2014.

ARITA, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem Biophys Res Commun**, v.257, p. 79–83, 1999.

ARITA, Y.; KIHARA, S.; OUCHI, N.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; OKAMOTO, Y.; KUMADA, M.; HOTTA, K.; NISHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, T.; SHIMOMURA, I.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BBbinding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. **Circulation**, v.105, p. 2893-2898, 2002.

ARIYASU, H.; TAKAYA, K.; HOSODA, H.; IWAKURA, H.; EBIHARA, K. *et al.* Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced adiponectin and improved insulin sensitivity. **Endocrinology**, v.145, p.367–383, 2002.

ASTRUP, A. Healthy lifestyles in Europe: prevention of obesity and type II diabetes by diet and physical activity. **Public Health Nutrition**, v.4, p.499–515, 2001.

BACHA, F.; SAAD, R.; GUNGOR, N.; ARSLANIAN, S.A. Adiponectin in youth relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. **Diabetes Care**, v.27, p.547–552, 2004.

BACKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L.V.; KOH, G.Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.101, p.15718–15723, 2004.

BACKHED, F.; MANCHESTER, J.K.; SEMENKOVICH, C.F.; GORDON, J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p.979–984, 2007.

BALKAU, B.; CHARLES, M.A. Comment on the provisional report from the WHO consultation: European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). **Diabetic Med**, v. 16, p. 442–443, 1999.

BARBE, P.; MILLET, L.J.; GALITZKI, M.; LAFONTAN; BERLAN, M. In situ assessment of the role of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood flow in human subcutaneous adipose tissue, v.117, p.907-913, 1996.

BARNETT, B.P.; HWANG, Y.; TAYLOR, M.S.; KIRCHNER, H.; PFLUGER, P.T.; BERNARD, V.; LIN, Y.Y.; BOWERS, E.M.; MUKHERJEE, C.; SONG, W.J. *et al.* Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. **Science**, v.330, p.1689–1692, 2010.

BASU, S.; YOFFE, P.; HILLS, N.; LUSTIG, R.H. The relationship of sugar to population level diabetes prevalence: an econometric analysis of repeated cross-sectional data. **PLOS ONE**, v.8, e57973, 2013.

BEDNAREK, M.A.; FEIGNER, S.D.; PONG, S.S.; MCKEE, K.K.; HRENIUK, D.L.; SILVA, M.V.; WARREN, V.A.; HOWARD, A.D.; VAN DER PLOEG, L.H.; HECK, J.V. Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. **J Med Chem**, v.43, p.4370-4376, 2000.

BELFER, I.; BUZAS, B.; EVANS, C.; HIPPEL, C.; PHILLIPS, G.; TAUBMAN, J.; LORINCZ, I.; LIPSKY, R.H.; ENOCH, M.A.; MAX, M.B.; GOLDMAN, D. Haplotype structure of the beta adrenergic receptor genes in US Caucasians and African Americans European. **Journal of Human Genetics**, v.13, p.341–351, 2005.

BELLIA, A.; GIARDINA, E.; LAURO, D.; TESAURO, M.; DI FEDE, G.; CUSUMANO, G.; *et al.* 'The Linosa Study': epidemiological and heritability data of the metabolic syndrome in a Caucasian genetic isolate. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.19, p.455–461, 2009.

BELTRÁN-SÁNCHEZ, H.; HARHAY, M.O.; HARHAY, M.M.; MCELLIGOTT, S. Prevalence and trends of metabolic syndrome in the adult U.S. population, 1999-2010. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, p. 697-703, 2013.

BENYAMIN, B.; MIDDELBERG, R.P.; LIND, P.A.; VALLE, A.M.; GORDON, S.; NYHOLT, D.R.; MEDLAND, S.E.; HENDERS, A.K.; HEATH, A.C.; MADDEN, P.A. *et al.* GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. **Hum Mol Genet**, v.20, p.4504-4514, 2011.

BERGMAN, R. N.; KIM, S.P.; CATALANO, K.J.; HSU, I.R.; CHIU, J.D.; KABIR, M.; HUCKING, K.; ADER, M. Why visceral fat is bad: mechanisms of the metabolic syndrome. **Obesity**, v.14, p.16S–19S, 2006

BIERY, A.J.; EBBESSON, S.O.; SHULDINER, A.R.; BOYER, B.B. The 3-adrenergic receptor TRP64ARG polymorphism and obesity in Alaskan Eskimos. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.21, p.1176–1179, 1997.

BING, C.; AMBYE, L.; FENGER, M.; JORGENSEN, T.; BORCH-JOHNSSEN, K.; MADSBAD, S. *et al.* Large-scale studies of the leu72met polymorphism of the ghrelin gene in relation to the metabolic syndrome and associated quantitative traits. **Diabet Med**, v.22, p.1157–1160, 2005.

BLOK, W. L.; J.; DESLYPERE, J.P.; DEMACKER, P.N.; VAN DER VEN-JONGEKRIJG J.; HECTOR, M.P.; VAN DER MEER, J.W.; KATAN, M.B. Pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy volunteers fed various doses of fish oil for 1 year. **European Journal Clinical Investigation**, v. 27, p.1003 – 1008, 1997.

BOSY-WESTPHAL, A.; ONUR, S.; GEISLER, C.; WOLF, A.; KORTH, O.; PFEUFFERM, M.; SCHREZENMEIR, J.; KRAWCZAK, M.; MÜLLER, M.J. Common familial influences on clustering of metabolic syndrome traits with central obesity and insulin resistance: the Kiel obesity prevention study. **Int J Obes**, v. 31, p.784-90, 2007.

BRACALE, R.; PASANISI, F.; LABRUNA, G.; FINELLI, C.; NARDELLI, C.; BUONO, P.; SALVATORI, G.; SACCHETTI, L.; CONTALDO, F.; ORIANI, G. Metabolic syndrome and ADRB3 gene polymorphism in severely obese patients from South Italy. **Eur J Clin Nutr**, v.61, p.1213–1219, 2007.

BRAND, J.S.; ROVERS, M.M.; YEAP, B.B.; SCHNEIDER, H.J.; TUOMAINEN, T.P. *et al.* Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome in men: an individual participant data meta-analysis of observational studies. **PLOS ONE**, v. 9, e100409, 2014.

BRASAEMLE, D.L.; BARBER, T.; WOLINS, N.E.; SERRERO, G.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J.; LONDOS, C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. **J Lipid Res**, v.38, p.2249–2263, 1997.

BRAY, G.A. Medical consequences of obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p.2583-2589, 2004.

BRIETZKE, S. A. Controversy in diagnosis and management of the metabolic syndrome. **Medical Clinics of North America**. v. 91, p. 1041–1061, 2007.

BRULEY, C.; LYONS, V.; WORSLEY, A.G.; WILDE, M.D.; DARLINGTON, G.D.; MORTON, N.M.; SECKL, J.R.; CHAPMAN, K.E. A novel promoter for the 11 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene is active in lung and is C/EBP α -independent. **Endocrinology**, v.147, p.2879–2885, 2006.

BRUNZELL, J.; DEEB, S. Familial lipoprotein lipase deficiency, apo CII deficiency, and hepatic lipase deficiency. In: **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. p. 2789, New York, 2001.

BRUNZELL, J. Clinical practice.Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med*, v. 357, p.1009–1017, 2007.

BRUNZELL, J.D.; FAILOR, R.A. Diagnosis and treatment of dyslipidemia.**ACP Medicine**, p.1-23, 2010.

BUJALSKA, I.J.; KUMAR, S.; STEWART, P.M. Does central obesity reflect “Cushing’s disease of the omentum”? **Lancet**, v. 349, p.1210 –1213, 1997.

CAMERON,A.J.; SHAW,J.E.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.33, p. 351–375, 2004.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v.84, p.277-359, 2004.

CASSONI, P.; PAPOTTI, M.; GHE, C.; CATAPANO, F.; SAPINO, A.; GRAZIANI, A.; DEGHENGI, R.; REISSMANN, T.; GHIGO, E.; MUCCIOLI, G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in humans breast carcinomas and cell lines. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.1738-1745, 2001.

CHAN, J.C.; MALIK, V.; JIA, W.; KADOWAKI, T.; YAJNIK, C.S.; YOON, K.H.; HU, F.B. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. **JAMA**, v.301, p.2129–2140, 2009.

CHAPMAN, K.; HOLMES, M.; SECKL, J. 11β -Hydroxysteroid Dehydrogenases: Intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. **Physiological Reviews**, v. 93, p.1139-1206, 2013.

CHAUDHARY, K.; BUDDINENI, J.P.; NISTALA, R.; WHALEY-CONNELL, A. Resistant hypertension in the high-risk metabolic patient. **Curr Diab Rep**, v.11, p. 41-46, 2011.

CHEUNG, B.M.Y. ; THOMAS, G.N. The metabolic syndrome and vascular disease in Asia. **Cardiovascular and Hematological Disorders**, v. 7, p. 79–85, 2007.

CHEUNG, C.Y.; HUI, E.Y.L.; CHEUNG, B.M.Y.; WOO, Y.C.; XU, A.; FONG, C.H.Y.; ONG, K.L.; YEUNG, C.Y.; JANUS, E.D.; TSE, H.F.; *et al.* Adiponectin gene variants and the risk of coronary heart disease: a 16-year longitudinal study. **Eur J Endocrinol**, v.171, p.107-15, 2014.

CHIBALIN, A.V.; LENG, Y.; VIEIRA, E.; KROOK, A.; BJÖRNHOLM, M.; LONG, Y.C. KOTOVA, O.; ZHONG, Z.; SAKANE, F.; STEILER, T. *et al.* Down regulation of diacylglycerol kinase delta contributes to hyperglycemia-induced insulin resistance. **Cell**, v.132, p.375–386 2008.

CICCARELLI, M.; SANTULLI, G.; PASCALE, V.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. Adrenergic receptors and metabolism: role in development of cardiovascular disease. **Front Physiol**, v.4, p.1-5, 2013.

CIVELEK, M.; LUSIS A. Conducting the metabolic syndrome orchestra. **Nature Genetics**, v.43, p 506-507, 2011.

CLEEMAN, J. I. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). **J Am Med Assoc**, v. 285, p. 2486–2497, 2001.

CLÉMENT, K.; VAISSE, C.; MANNING, B.S.; BASDEVANT, A.; GUY-GRAND, B.; RUIZ, J.; SILVER, K.D.; SHULDINER, A.R.; FROGUEL, P.; STROSBERG, A.D. Genetic variation in the β_3 -adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. **N Engl J Med**, v.333, p.352–354, 1995.

COGILL, B. Anthropometric Indicators Measurement Guide. FANTA Publications, 2003.

COHEN, S. S.; GAMMON, M.D.; NORTH, K.E.; MILLIKAN, R.C.; LANGE, E.M.; WILLIAMS, S.M.; ZHENG, W.; CAI, Q.; LONG, J.; SMITH, J.R.; *et al.* ADIPOQ, ADIPOR1, and ADIPOR2 Polymorphisms in Relation to Serum Adiponectin Levels and BMI in Black and White Women. **Obesity**, v. 19, p.2053-62, 2011.

COLAGIURI, S. Diabetes: therapeutic options. **Diabetes Obes Metab**, v.12, p.463–473, 2010.

COLBORN, T.; VOM SAAL, F.S.; SOTO, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ Health Perspect**, v. 101, p. 378–384, 1993.

COMBS, T.P.; PAJVANI, U.B.; BERG, A.H. *et al.* A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating. **Lett**, v.369, p.75–79, 2004.

CORBALAN, M.S.; MARTI, A.; MARTINEZ-GONZALEZ, M.A.; MARTINEZ, J.A. The 27Glu polymorphism of the b2-adrenergic receptor gene interacts with physical activity on obesity risk among female subjects. **Clin Genet**, v.61, p.305-307, 2002.

COWLEY, M.A.; SMITH, R.G.; DIANO, S.; TSCHÖP, M.; PRONCHUK, N.; GROVE, K.L.; STRASBURGER, C.J.; BIDLINGMAIER, M.; ESTERMAN, M.; HEIMAN, M.L. *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. **Neuron**, v.37, p.649–661, 2003.

CYPESS, A.M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; TAL, I.; RODMAN, D.; GOLDFINE, A.B.; KUO, F.C.; PALMER, E.L.; TSENG, Y.H.; DORIA, A.; KOLODNY, G.M.; KAHN, C.R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. **N Engl J Med**, v. 360, p.1509-1517, 2009.

DA SILVA, R. C. Q.; MIRANDA, W. L.; CHACRA, A. R.; DIB, S. A. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance in Normal Glucose Tolerant Brazilian Adolescents With Family History of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 28, p. 3 716- 3718, 2005.

DABELEA, D.; HANSON, R.L.; LINDSAY, R.S.; PETTITT, D.J.; IMPERATORE, G.; GABIR, M.M.; ROUMAIN, J.; BENNETT, P.H.; KNOWLER, W.C. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. **Diabetes**, v.49, p.679-692, 2000.

DALEN, K.T.; DAHL, T.; HOLTER, E.; ARNTSEN, B.; LONDOS, C.; SZTALRYD, C.; NEBB, H.I. LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues. **Biochim Biophys Acta**, v.1771, p. 210–227, 2007.

DANTAS, V.L.; LUPE FURTADO-ALLE, RICARDO L.R. SOUZA, AND ELEIDI A. CHAUTARD-FREIRE-MAIA Obesity and variants of the GHRL (ghrelin) and BCHE (butyrylcholinesterase) genes. **Genet Mol Biol**, v.34, p. 205–207, 2011.

DE COSTER, S.; LAREBEKE, N.V. Endocrine-Disrupting Chemicals: Associated Disorders and Mechanisms of Action. **Journal of Environmental and Public Health** v. 2012, p. 1-52, 2012.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J.P.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in

shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, p.14691–14696, 2010.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care**, v.14, p.173-194, 1991.

DERAM, S.; NICOLAU, C.Y.; PEREZ-MARTINEZ, P.; GUAZZELLI, I.; HALPERN, A.; WAJCHENBERG, B.L.; ORDOVAS, J.M.; VILLARES, S.M. Effects of Perilipin (PLIN) Gene Variation on Metabolic Syndrome Risk and Weight Loss in Obese Children and Adolescents. **J Clin Endocrinol Met**, v. 93, p.4933-4940, 2008.

DESPRES, J.P.; LEMIEUX, I.; BERGERON, J.; PIBAROT, P.; MATHIEU, P.; LAROSE, E.; RODÉS-CABAU, J.; BERTRAND, O.F.; POIRIER, P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 28, p. 1039–1049, 2008.

DIABETES GENETICS INITIATIVE OF BROAD INSTITUTE OF HARVARD AND MIT, LUND UNIVERSITY, AND NOVARTIS INSTITUTES OF BIOMEDICAL RESEARCH, SAXENA, R.; VOIGHT, B.F.; LYSSENKO, V.; BURTT, N.P.; DE BAKKER, P.I.; CHEN, H.; ROIX, J.J.; KATHIRESAN, S.; HIRSCHHORN, J.N. *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. **Science**, v.316, p.1331-1336, 2007.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E.; BOURGUIGNON, J.P.; GIUDICE, L.C.; HAUSER, R.; PRINS, G.S.; SOTO, A.M.; ZOELLER, R.T.; GORE, A.C. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 293–342, 2009.

DIAZ, E.; PFEFFER, S.R. TIP47: a cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. **Cell**, v.93, p.433–443, 1998.

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010.

DORIA, A.; PATTI, M.E.; KAHN, C.R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. **Cell Metab**, v.8, p.186–200, 2008.

DORN II, G.W. Adrenergic Signaling Polymorphisms and Their Impact on Cardiovascular Disease. **Physiological Reviews**, v. 90, p.1013-1062, 2010.

DRAPER, N.; WALKER, E.A.; BUJALSKA, I.J.; TOMLINSON, J.W.; CHALDER, S.M.; ARLT, W.; LAVERY, G.G.; BEDENDO, O.; RAYDW, LAING, I.; MALUNOWICZ, E.; WHITE, P.C.; HEWISON, M.; MASON, P.J.; CONNELL, J.M.; SHACKLETON, C.H.; STEWART, P.M. Mutations in the genes encoding 11 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase interact to cause cortisone reductase deficiency. **Nature Genetic**, v.34, p.434–439, 2003.

DUARTE, N.L.; COLAGIURI, S.; PALU, T.; WANG, X.L.; WILCKEN, D.E. Obesity, Type II diabetes and the beta 2 adrenoceptor gene Gln27Glu polymorphism in the Tongan population. **Clin Sci**, v.104 p.211-215, 2003.

DUJIC, T.; BEGO, T.; MLINAR, B.; SEMIZ, S.; MALENICA, M.; PRNJAVORAC, B.; OSTANEK, B.; MARC, J.; CAUSEVIC, A. Association between 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms and metabolic syndrome in Bosnian population. **Biochem Med**, v. 22, p.76–85, 2012.

DUPUIS, J.; LANGENBERG, C.; PROKOPENKO, I. *et al.* New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. **Nature Genetic**, v.42, p.105-116, 2010.

EBERLY, I.E.; PRINEAS, R.; COHEN, J.D.; VAZQUEZ, G.; ZHI, X.; NEATON, J.D.; KULLER, L.H.; MULTIPLE RISK FACTOR INTERVENTION TRIAL RESEARCH GROUP. Metabolic syndrome: risk factor distribution and 18-year mortality in the multiple risk factor intervention trial. **Diabetes Care**, v. 29, p. 123–130, 2006.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **LANCET**, v. 365, p.1415–1428, 2005.

EINHORN, D.; REAVEN, G.M.; COBIN, R.H.; FORD, E.; GANDA, O.P.; HANDELSMAN, Y.; HELLMAN, R.; JELLINGER, P.S.; KENDALL, D.; KRAUSS, R.M.; NEUFELD, N.D.; PETAK, S.M.; RODBARD, H.W.; SEIBEL, J.A.; SMITH, D.A.; WILSON, P.W. American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. **Endocr Pract**, v. 9, p. 237–252, 2003.

ELLSWORTH, D.L.; COADY, S.A.; CHEN, W.; SRINIVASAN, S.R.; ELKASABANY, A.; GUSTAT, J.; BOERWINKLE, E.; BERENSON, G.S. Influence of the beta2-adrenergic receptor Arg16Gly polymorphism on longitudinal changes in obesity from childhood through young adulthood in a biracial cohort: the Bogalusa Heart Study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.26, p.928–937, 2002.

EMORINE, L.J.; MARULLO, S.; BRIEND-SUTREN, M.M.; PATEY, G.; TATE, K.; DELAVIER-KLUTCHKO, C.; STROSBURG, A.D. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. **Science**, v. 245, p.1118-1121, 1989.

ENGELHORN, C. A.; MORAIS FILHO, D.; BARROS, F. S.; COELHO, N. A. Guia Prático de Ultrassonografia Vascular. 2. Dilivros, 2010.

ENOCKSSON, S.; SHIMIZU, F.; LÖNNQVIST, J.; NORDENSTRÖM, ARNER, P. Demonstration of an in vivo functional b3-adrenoceptor in man. **J.Clin. Invest**, v.95, p.2239–2245, 1995.

ENOCKSSON, S.; TALBOT, M.; RIFE, F.; TAMBORLANE, W.V.; SHERWIN, R.S.; CAPRIO, S. Impaired in vivo stimulation of lipolysis in adipose tissue by selective beta2-adrenergic agonist in obese adolescent girls. **Diabetes**, v.49, p.2149 – 2153, 2000.

ERDMANN, J.; TOPSCH, R.; LIPPL, F.; GUSSMANN, P.; SCHUSDZIARRA, V. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to

food intake, plasma insulin, and glucose. **J Clin Endocrinol Metabol**, v.89, p.3048-3054, 2004.

FASSHAUER, M.; KLEIN, J.; NEUMANN, S.; ESZLINGER, M.; PASCHKE, R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v.290, p.1084-1089, 2002.

FAUCI, A.S.; BRAUNWALD, E.; KASPER, D.L.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th Edition (Harrison's Principles of Internal Medicine), 2008. Versão editada disponível em: <www.acesmedicine.com> . Acesso em 02/02/2015.

FEDERSPIL, G.; NISOLI, E.; VETTOR, R. A critical reflection on the definition of metabolic syndrome. **Pharmacological Research**, v. 53, p. 449–456, 2006.

FERGUSON, J.F.; PHILLIPS, C.M.; TIERNEY, A.C; *et al.* Gene–nutrient interactions in the metabolic syndrome: single nucleotide polymorphisms in ADIPOQ and ADIPOR1 interact with plasma saturated fatty acids to modulate insulin resistance. **Am J Clin Nutr**, v.91, p.794–801, 2010.

FERRANNINI, E.; HAFFNER, S.M.; MITCHELL, S.M.P. Hyperinsulinemia: the key feature of a cardiovascular and metabolic syndrome. **Diabetologia**, v. 34, p. 416-422, 1991.

FLORES-MATEO, G.; ROJAS-RUEDA, D.; BASORA, J.; ROS, E.; SALAS-SALVADÓ, J. Nut intake and adiposity: meta-analysis of clinical trials. **Am J Clin Nutr**, v. 97, p.1346–1355, 2013.

FORD, E.S.; GILES, W.H.; DIETZ, W.H. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **J Am Med Assoc**, v.287, p.356–359, 2002.

FRANKS, P.W.; KNOWLER, W.C.; NAIR, S.; KOSKA, J.; LEE, Y.H.; LINDSAY, R.S.; WALKER, B.R.; LOOKER, H.C.; PERMANA, P.A.; TATARANNI, P.A.; HANSON, R.L. Interaction between an 11_HSD1 gene variant and birth era modifies the risk of hypertension in Pima Indians. **Hypertension**, v. 44, p.681–688, 2004.

FRAYN, K.N.; KARPE, F.; FIELDING, B.A.; MACDONALD, I.A.; COPPACK, S.W. Integrative physiology of human adipose tissue. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 27, p.875–888, 2003.

FREEMAN, M.S.; MANSFIELD, M.J.; BARRETT, J.H.; GRANT, P.J. Heritability of features of the insulin resistance syndrome in a community-based study of healthy families. **Diabetic Medicine**, v.19, p.994–999, 2002.

FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v.18, p.499-502, 1972.

FURTADO-ALLE, L.; ANDRADE, F.A.; NUNES, K.; MIKAMI, L.R.; SOUZA, R.L.; CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E.A. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. **Chemical Biology Interaction**, v.175, p.115-118, 2008.

GABLE, D.R.; HUREL, S.J.; HUMPHRIES, S.E. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.188, p.231–244, 2006.

GAMBINERI, A.; TOMASSONI, F.; MUNARINI, A.; STIMSON, R.H.; MIONI, R.; PAGOTTO, U.; CHAPMAN, K.E.; ANDREW, R.; MANTOVANI, V.; PASQUALI, R. *et al.* A combination of polymorphisms in HSD11B1 associates with in vivo 11 β -HSD1 activity and metabolic syndrome in women with and without polycystic ovary syndrome. **Eur J Endocrinol**, v. 165, p. 283-292, 2011.

GARCIA-RIOS, A.; DELGADO-LISTA, J.; PEREZ-MARTINEZ, P.; PHILLIPS, C.M.; FERGUSON, J.F.; GJELSTAD, I.M.; WILLIAMS, C.M.; KARLSTRÖM, B.; KIEĆ-WILK, B.; BLAAK, E.E. Genetic variations at the lipoprotein lipase gene influence plasma lipid concentrations and interact with plasma n-6 polyunsaturated fatty acids to modulate lipid metabolism. **Atherosclerosis**, v.218, p.416-422, 2011.

GARENC, C.; PÉRUSSE, L.; CHAGNON, Y.C.; RANKINEN, T.; GAGNON, J.; BORECKI, I.B.; LEON, A.S.; SKINNER, J.S.; WILMORE, J.H.; RAO, D.C.; BOUCHARD, C.; HERITAGE FAMILY STUDY. Effects of beta2-adrenergic receptor gene variants on adiposity: the HERITAGE Family Study. **Obes Res**, v.11, p.612–618, 2003.

GARN, S.M.; LEONARD, W.R.; HAWTHORNE, V.M. Three limitations of the body mass index. **Am J Clin Nutr**, v. 44, p. 996-997, 1986.

GATHERCOLE, L.L.; LAVERY, G.G.; MORGAN, S.A.; COOPER, M.S.; SINCLAIR, A.J.; TOMLINSON, J.W.; STEWART, P.M. 11 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1: Translational and Therapeutic Aspects. **Endocrine Reviews**, v. 34, p.525–555, 2013.

GEER, E.B.; SHEN, W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. **Gend Med**, v. 6, p.60-75, 2009.

GESTA, S.; TSENG, Y.H.; KAHN, C.R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. **Cell**, v.131, p.242–256, 2007.

GIACCHETTI, G.; FALOIA, E.; MARINIELLO, B.; SARDU, C.; GATTI, C.; CAMILONI, M.A.; GUERRIERI, M.; MANTERO, F. Overexpression of the rennin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. **Am J Hypertens**, v.15, p.381-388, 2002.

GIMENO, R.E.; KLAMAN, L.D. Adipose tissue as an active endocrine organ: recent advances. **Curr Opin Pharmacology**, v.5, p.122–128, 2005.

GLOBAL ASSESSMENT OF THE STATE-OF-THE-SCIENCE OF ENDOCRINE DISRUPTORS. IN: International Programme for Chemical Safety (IPCS). Chapter 1:

Executive Summary, 1–3, (2010). Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch1.pdf>>. Acesso em 20/12/2014.

GLUCKMAN, P. D. Evolving a definition of disease. **Archives of Disease in Childhood**, v.92, p.1053–1054, 2007.

GOLDSTEIN, J.L.; HOBBS, H.H.; BROWN, M.S. Familial hypercholesterolemia. In: **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. P. 2863, New York, 2001.

GONZÁLEZ SÁNCHEZ, J.L.; PROENZA, A.M.; MARTÍNEZ LARRAD, M.T.; RAMIS, J.M.; FERNÁNDEZ PÉREZ, C.; PALOU, A.; SERRANO RÍOS, M. The glutamine 27 glutamic acid polymorphism of the beta2-adrenoceptor gene is associated with abdominal obesity and greater risk of impaired glucose tolerance in men but not in women: a population-based study in Spain. **Clin Endocrinol**, v.59, p. 476–481, 2003.

GONZALEZ, E.L.; JOHANSSON, S.; WALLANDER, M.A.; RODRIGUEZ, L.A. Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996–2005. **J Epidemiol Community Health**, v.63, p.332–336, 2009.

GOULART, A.C.; SANTOS, I.S.; LOTUFO, P.A.; BENSEÑOR, I.M. Gender aspects of the relationship between migraine and cardiovascular risk factors: A cross-sectional evaluation in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). **Cephalgia**, 2015.[Epub ahead of print]

GRANNEMAN, J.G.; LAHNERS, K.N.; CHAUDHRY, A. Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. **Mol Pharmacol**, v.44, p.264-270, 1993.

GREEN, S.A.; TURKI, J.; INNIS, M.; LIGGETT, S.B. Amino-Terminal Polymorphisms of the Human .beta.2-Adrenergic Receptor Impart Distinct Agonist-Promoted Regulatory Properties. **Biochemistry**, v.33, p 9414–19, 1994.

GREEN, S.A.; TURKI, J.; HALL, I.P.; LIGGETT, S.B. Implications of genetic variability of human beta 2-adrenergic receptor structure. **Pulm Pharmacol**, v.8, p.1–10, 1995.

GRONNER, M.F.; BOSI, P.L.; CARVALHO, A.M.; CASALE, G.; CONTRERA, D.; PEREIRA, M.A.; DIOGO, T.M.; TORQUATO, M.T.; SOUZA, G.M.; OISHI, J.; LEAL, A.M. Prevalence of metabolic syndrome and its association with educational inequalities among Brazilian adults: a population-based study. **Journal of Medical Biological Research**, v. 44, p.713-719, 2011.

GRUNDY, S.M. Metabolic syndrome pandemic. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.28, p.629-636, 2008.

GUTIERREZ, J.A.; SOLENBERG, P.J.; PERKINS, D.R.; WILLENCY, J.A.; KNIERMAN, M.D.; JIN, Z.; WITCHER, D.R.; LUO, S.; ONYIA, J.E.; HALE, J.E. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.105, p.6320-6325, 2008.

HAFFNER, S.; TAEGTMEYER, H. Epidemic obesity and the metabolic syndrome. **Circulation**, v. 108, p. 1541–1545, 2003.

HALUZÍK, M.; PAŘÍZKOVÁ, J.; HALUZÍK, M.M. Adiponectin and Its Role in the Obesity-Induced Insulin Resistance and Related Complications. **Physiol Res**, v.53, p.123-129, 2004.

HARBER, E.P.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI, A.R. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.45, p. 219-227, 2001.

HARTWEG, J.; R. PERERA, V.; MONTORI, S.; DINNEEN, H.A.; FARMER, A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database Syst. Rev.**, 2008.

HAVEL, R.; KANE, J. Introduction: structure and metabolism of plasma lipoproteins. In: **The metabolic and molecular bases of inherited disease**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2001.

HEID, H.W.; SCHNOLZER, M.; KEENAN, T.W. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. **Biochem J**, v.320, p.1025–1030, 1996.

HEID, H.W.; MOLL, R.; SCHWETLICK, I.; RACKWITZ, H.R.; KEENAN, T.W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. **Cell Tissue Res**, v.294, p.309–321, 1998.

HEID, I.M.; HENNEMAN, P.; HICKS, A.; COASSIN, S.; WINKLER, T.; AULCHENKO, Y.S.; FUCHSBERGER, C.; SONG, K.; HIVERT, M.F.; WATERWORTH, D.M.; *et al.* Clear detection of ADIPOQ locus as the major gene for plasma adiponectin: results of genome-wide association analyses including 4659 European individuals. **Atherosclerosis**, v.208, p.412–420, 2010.

HEID, I.M.; WAGNER, S.A.; GOHLKE, H.; IGLSEDER, B.; MUELLER, J.C.; CIP, P.; LADURNER, G.; REITER, R.; STADLMAYR, A.; MACKEVICS, V.; *et al.* Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. **Diabetes**, v.55, p.375–84, 2006.

HEMMINKI, K.; LI, X.; SUNDQUIST, K.; SUNDQUIST, J. Familial risks for type 2 diabetes in Sweden. **Diabetes Care**, v.33, p.293-297, 2010.

HENNEMAN, P.; AULCHENKO, Y.S.; FRANTS, R.R.; VAN DIJK, K.W.; OOSTRA, B.A.; VAN DUIJN, C.M. Prevalence and heritability of the metabolic syndrome and its individual components in a Dutch isolate: the Erasmus Rucphen Family study. **Journal Medical Genetic**, v.45, p. 572– 577, 2008.

HENRY, R.R.; WALLACE, P.; OLEFSKY, J.M. Effects of weight loss on mechanism of hyperglycaemia in obese non insulin dependent diabetes mellitus. **Diabetes**, v.35, p.990–999, 1986.

HEPPNER, K.M.; TONG, J. Regulation of glucose metabolism by the ghrelin system: multiple players and multiple actions. **Eur J Endocrinol**, v.171, p.R21–R32, 2014.
HERDER, C.; RODEN, M. Genetics of type 2 diabetes: pathophysiologic and clinical relevance. **Eur J Clin Invest**, v.41, p.679,692, 2011.

HERMANOWSKI-VOSATKA, A.; GERHOLD, D.; MUNDT, S.S.; LOVING, V.A.; LU, M.; CHEN, Y.; ELBRECHT, A.; WU, M.; DOEBBER, T.; KELLY, L.; *et al.* PPAR α agonists reduce 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 279, p.330–336, 2000.

HILDEBRANDT, M.A.; HOFFMANN, C.; SHERRILL-MIX, S.A.; KEILBAUGH, S.A.; HAMADY, M.; CHEN, Y.Y.; KNIGHT, R.; AHIMA, R.S.; BUSHMAN, F.; WU, G.D. High fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. **Gastroenterology**, v.137, p.1716–1724, 2009.

HINNEY, A.; HOCH, A.; GELLER, F.; SCHAFER, H.; SIEGFRIED, W.; GOLDSCHMIDT, H.; REMSCHMIDT, H.; HEBEBRAND, J. Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. **J Clin Endocr Metab**, v.87, p.2716–2719, 2002.

HOCHBERG, Z.; FREIL, R.; CONSTANCIA, M.; FRAGA, M.; JUNIEN, C.; CAREL, J.C.; BOILEAU, P.; LE BOUC, Y.; DEAL, C.L.; LILLYCROP, K. *et al.* Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. **Endocr Review**, v.32, p.159–224, 2011.

HOLDSTOCK, C.; ENGSTROM, B.E.; OHRVALL, M.; LIND, L.; SUNDBOM, M.; *et al.* Ghrelin and adipose tissue regulatory peptides: effect of gastric bypass surgery in obese humans. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, p.3177–3183, 2003.

HOLLENBECK, C.B. Dietary fructose effects on lipoprotein metabolism and risk for coronary artery disease. **Am. J. Clin. Nutr.** v.58, p. 800S–809S, 1993.

HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; TAKEDA, T.; YAMAMOTO, T.; *et al.* Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. **J Biol Chem**, v.275, p.11404–11, 2000.

HORTON, J.D.; GOLDSTEIN, J.L.; BROWN, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. **J. Clin. Invest.** v.109, p.1125–1131, 2002.

HOTAMISLIGIL, G.S.; ARNER, P.; CARO, J.F.; ATKINSON, R.L.; SPIEGELMAN, B.M. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. **J. Clin. Invest.** v.95, p.2409–2415, 1995.

HSUEH, W.; ABEL, E.D.; BRESLOW, J.L.; MAEDA, N.; DAVIS, R.C.; FISHER, E.A.; DANSKY, H.; MCCLAIN, D.A.; MCINDOE, R.; WASSEF, M.K.; *et al.* Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. **Circ. Res**, v.100, p.1415–1427, 2007.

HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J Biol Chem**, v.271, p.10697–10703, 1996.

HUANG, C.J.; HAATAJA, L.; GURLO, T.; BUTLER, A.E.; WU, X.; SOELLER, W.C.; BUTLER, P.C. Induction of endoplasmic reticulum stress-induced beta-cell apoptosis and accumulation of polyubiquitinated proteins by human islet amyloid polypeptide. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab** v293, p.E1656–E1662, 2007.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, (2006). Disponível em <<http://www.idf.org/metabolic-syndrome>> . Acesso em 27/12/2014.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, (2010). Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/>. Acesso em 20/12/2014.

IWAMOTO, N.; OGAWA, Y.; KAJIHARA, S.; HISATOMI, A.; YASUTAKE, T.; YOSHIMURA, T.; MIZUTA, T.; HARA, T.; OZAKI, I.; YAMAMOTO, K. Gln27Glu beta2-adrenergic receptor variant is associated with hypertriglyceridemia and the development of fatty liver. **Clin Chim Acta**, v. 314, p.85–91, 2001.

JIN, F.; LU C.; SUN, X.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. Insights into the binding modes of human β 3-adrenergic receptor agonists with ligand-based and receptor-based methods. **Mol Divers**, 2011.

JOHNSON, R.J.; PEREZ-POZO, S.E.; SAUTIN, Y.Y.; MANITIUS, J.; SANCHEZ-LOZADA, L.G.; FEIG, D.I.; SHAFIU, M.; SEGAL, M.; GLASSOCK, R.J.; SHIMADA, M.; RONCAL, C.; NAKAGAWA, T. Hypothesis: could excessive fructose intake and uric acid cause type 2 diabetes? **Endocr Rev**, v.30, p. 96–116, 2009.

KADOWAKI, H.; YASUDA, K.; IWAMOTO, K.; OTABE, S.; SHIMOKAWA, K.; SILVER, K.; WALSTON, J.; YOSHINAGA, H.; KOSAKA, K.; YAMADA, N.; SAITO, Y.; HAGURA, R.; AKANUMA, Y.; SHULDINER, A.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. A mutation in the β 3-adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinaemia in Japanese subjects. **Biochem Biophys Res Commun**, v.215, p. 555-560, 1995.

KAGEYAMA, H.; FUNAHASHI, H.; HIRAYAMA, M.; TAKENOYA, F.; KITA, T.; KATO, S.; SAKURAI, J.; LEE, E.Y.; INOUE, S.; DATE, Y. *et al.* Morphological analysis of ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. **Regul Pept**, v.126, p.67–71, 2005.

KAHN, S.E.; HULL, R.L.; UTZSCHNEIDER, K.M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v.444, p.840–846, 2006.

KANE, J.P.; HAVEL, R.J. Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B apolipoproteins. In *The Online Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, capítulo 15: Disponível em <<http://ommbid.mhmedical.com/content.aspx?bookid=474§ionid=45374110>>. Acesso em 22/12/2014.

KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. **Ann Intern Med**, v.90, p.85, 1979.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiol Res Pract**, v. 2014, p.1-21, 2014.

KAWAI, T.; OHISHI, M.; TAKEYA, Y.; ONISHI, M.; ITO, N.; YAMAMOTO, K.; OGURO, R.; KAMIDE, K.; RAKUGI, H. Adiponectin single nucleotide polymorphism is a genetic risk factor for stroke through high pulse wave pressure: a cohort study. **J Atheroscler Thromb**, v. 20, p.152-160, 2013.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 89, p. 2548–2556, 2004.

KEYS, A.; MENOTTI, A.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; DJORDEVIC, B.S.; BUZINA, R.; DONTAS, A.S.; FIDANZA, F.; KARVONEN, M.J.; KIMURA, N.; *et al.* The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. **Prev Med**, v.13, p.141–154, 1984.

KHABOUR, O.F.; WEHAIBI, S.H.; AL-AZZAM, S.I.; ALZOUBI, K.H.; EL-AKAWI, Z.J. Association of adiponectin with hypertension in type 2 diabetic patients: the gender effect. **ClinExpHypertens**, v.35, p.361-6, 2013

KIM, O.Y.; CHO, E.Y.; PARK, H.Y.; JANG, Y.; LEE, J.H. Additive effect of the mutations in the beta3-adrenoceptor gene and UCP3 gene promoter on body fat distribution and glycemic control after weight reduction in overweight subjects with CAD or metabolic syndrome. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.28, p.434–441, 2004.

KIMMEL, A.R.; BRASAEMLE, D.L.; MCANDREWS-HILL, M.; SZTALRYD, C.; LONDOS, C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **J Lipid Res**, v.51, p.468–471, 2010.

KING, R.A.; ROTTER, J.I.; MOTULSKY, A.G. **The Genetic Basis of Common Disease**. Oxford University Press, New York, 2002.

KNIGHTS, A.J.; FUNNELL, A.P.W.; PEARSON, R.C.M.; CROSSLEY, M.; BELL-ANDERSON, K.S. Adipokines and insulin action. **Adipocyte**, v.3, p.88-96, 2014.

KNOWLER, W.C. Association of Trp64Arg mutation of the b3- adrenergic receptor gene with NIDDM. **Diabetologia**, v.39, p.1411, 1996.

KOBILKA, B.K.; FRIELLES, T.; DOHLMANS, H. G.; BOLANOWSKI, M.A.; DIXONY, R.A.F.; KELLERLI, P.; CARON, M.G.; LEFKOWITZS, R.J. Delineation of the Intronless Nature of the Genes for the Human and Hamster beta 2 Adrenergic Receptor and Their Putative Promoter Regions. **J Biol Chem**, v. 262, p 7321-7327, 1987.

KOJIMA, M.; HOSODA, H.; DATE, Y. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v.402, p.656-660, 1999.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: Structure and Function. **Physiological Reviews**, v.85, p.495-522, 2005.

KORBONITS, M.; GUEORGUIEV, M.; O'GRADY, E.; LECOEUR, C.; SWAN, D.C.; MEIN, C.A.; WEILL, J.; GROSSMAN, A.B.; FROGUEL, P. A variation in the ghrelin gene increases weight and decreases insulin secretion in tall, obese children. **J Clin Endocr Metab**, v.87, p.4005-4008, 2002.

KORBONITS, M.; GOLDSTONE, A.P.; GUEORGUIEV, M.; GROSSMAN, A.B. Ghrelin—a hormone with multiple functions. **Front Neuroendocrinol**, v.25, p.27–68, 2004.

KORYAKINA, Y.; JONES, S.M.; CORNETT, L.E.; SEELY, K.; BRENTS, L.; *et al.* Effects of the β -agonist, isoprenaline, on the down-regulation, functional responsiveness and trafficking of β 2-adrenergic receptors with N-terminal polymorphisms. **Cell BiolInt**, v.36, p.1171-83, 2012.

KRESSEL, G.; TRUNZ, B.; BUB, A.; HÜLSMANN, O.; WOLTERS, M.; LICHTINGHAGEN, R.; STICHTENOTH, D.O.; HAHN, A. Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk. **Atherosclerosis**, v.20, 2008.

KUHLEIN, H.V.; RECEVEUR, O. Dietary change and traditional food systems of indigenous peoples. **Annu Rev Nutr**, v.16, p.417–442, 1996.

KUMADA, M.; KIHARA, S.; SUMITSUJI, S.; KAWAMOTO, T.; MATSUMOTO, S.; OUCHI, N.; ARITA, Y.; OKAMOTO, Y.; SHIMOMURA, I.; HIRAOKA, H.; NAKAMURA, T.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; OSAKA CAD STUDY GROUP. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, p. 85– 89, 2003.

KUPELIAN, V.; PAGE, S.T.; ARAUJO, A.B.; TRAVISON, T.G.; BREMNER, W.J.; *et al.* Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. **J ClinEndocrinolMetab**, v.91, p.843-50, 2006.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, JR J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** v.19, p.5444, 1991.

LAKKA, H.M.; LAAKSONEN, D.E.; LAKKA, T.A.; NISKANEM, L.K.; KUMPUSALO, E.; TUOMILEHTO, J.; SALONEN, J.T. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. **JAMA**, v.288, p. 2709–2716, 2002.

LANASPA, M.A.; TAPIA, E.; SOTO, V.; SAUTIN, Y.; SÁNCHEZ-LOZADA, L.G. Uric Acid and Fructose: Potential Biological Mechanisms. **Sem Nephrol**, v. 31, p.426-432, 2011.

LARA-CASTRO, C.; YUCHANGFUA; CHUNGA, B.H.; GARVEY, W.T. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. **Current Opinion in Lipidology**, v.18, p.263–270, 2007.

LARGE, V.; HELLSTRÖM, L.; REYNISDOTTIR, S.; LÖNNQVIST, F.; ERIKSSON, P.; LANNFELT, L.; ARNER, P. Human beta-2 adrenoceptor gene polymorphisms are highly frequent in obesity and associate with altered adipocyte beta-2 adrenoceptor function. **J Clin Invest**, v.100, p.3005–3013, 1997.

LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; GAUL, P.; GREMEAUX, T.; GONZALEZ, T.; BARRES, R.; TANTI, J.F. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retro regulation of insulin signaling. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p.1152–1156, 2003.

LEE, S.; KIM, C.M.; KIM, H.J.; PARK, H.S. Interactive effects of main genotype, caloric intakes, and smoking status on risk of obesity. **Asia Pac J Clin Nutr**, v.20, p. 563–571, 2011.

LEITE, N.; VILELA JÚNIOR, G. B.; LOUZADA, F. M.; CIESLAK, F.; ALBUQUERQUE, A.M. Questionário de Avaliação da Qualidade de Vida e da Saúde - QVS-80. In: (Ed.). In: Mendes, Ricardo Alves e Leite, Neiva. Ginastica Laboral: princípios e aplicações práticas. Barueri: Manole, 2008. cap. 3.

LEY, R.E.; BACKHED, F.; TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D.; GORDON, J.I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, p.11070–11075, 2005.

LEY, R.E.; TURNBAUGH, P.J.; KLEIN, S.; GORDON, J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p.1022–1023, 2006.

LIBBY, P.; THEROUX, P. Pathophysiology of coronary artery disease. **Circulation**, v.111, p.3481–3488, 2005.

LIN, J. *et al.* Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 β coactivation of SREBP. **Cell**, v.120, p.261–273, 2005.

LIU, J.; PRUDOM, C.E.; NASS, R.; PEZZOLI, S.S.; OLIVERI, M.C.; JOHNSON, M.L.; VELDHUIS, P.; GORDON, D.A.; HOWARD, A.D.; WITCHER, D.R. *et al.* Novel ghrelin assays provide evidence for independent regulation of ghrelin. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, p.1980-1987, 2008.

LIVINGSTONE, D.E.; JONES, G.C.; SMITH, K.; JAMIESON, P.M.; ANDREW, R.; KENYON, C.J.; WALKER, B.R. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissuespecific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. **Endocrinology**, v.141, p.560–563, 2000.

LONDOS, C.; SZTALRYD, C.; TANSEY, J.T.; KIMMEL, A.R. Role of PAT proteins in lipid metabolism. **Biochimie**, v.87, p.45-49, 2005.

LORENZ, M. W.; MARKUS, H. S.; BOTS, M. L.; ROSVALL, M.; SITZER, M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. **Circulation**. v. 115, n. 4, p. 459-67, 2007.

LOVEJOY, J.C.; SMITH, S.R.; CHAMPAGNE, C. M.; MOST, M.; LEFEVRE, J. DELANY, P.; DENKINS, Y.M.; ROOD, J. C.; VELDHUIS, J.; BRAY, G.A. Effects of diets enriched in saturated (palmitic), monounsaturated (oleic), or trans (elaidic) fatty acids on insulin sensitivity and substrate oxidation in healthy adults. **Diabetes Care**, v.25, p.1283–1288, 2002.

LU, X.; GRUIA-GRAY, J.; COPELAND, N.G.; GILBERT, D.J.; JENKINS, N.A.; LONDOS, C.; KIMMEL, A.R. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. **Mamm.Genome**, v.12, p.741–749, 2001.

LUSIS, A.J.; ATTIE, A.D.; REUE, K. Metabolic Syndrome: from epidemiology to systems biology. **Nature review genetic**, v.9, p. 819–830, 2008.

LUU, N. T.; MADDEN, J.; CALDER, P. C.; GRIMBLE, R.F.; SHEARMAN, C.P.; CHAN, T.; DASTUR, N.; HOWELL, W.M.; RAINGER, G.E.; NASH, G.B. Dietary supplementation with fish oil modifies the ability of human monocytes to induce an inflammatory response. **J. Nutr.**v.137, p. 2769–2774, 2007.

MA, X.; LIN, L.; QIN, G.; LU, X.; FIOROTTO, M.; DIXIT, V.D.; SUN, Y. Ablations of Ghrelin and Ghrelin Receptor Exhibit Differential Metabolic Phenotypes and Thermogenic Capacity during Aging. **PLoS ONE**, v.6, p.1-10, 2011.

MAEDA, K.; OKUBO, K.; SHIMOMURA, I.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y.; MATSUBARA, K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochem Biophys Res Commun**, v.221, p.286–289, 1996.

MAEDA, N.; SHIMOMURA, I.; KISHIDA, K.*et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat Med**, v.8p.731–737, 2002.

MAGER, U.; KOLEHMAINEN, M.; LINDSTRÖM, J.; ERIKSSON, J.G.; VALLE, T.T.; HÄMÄLÄINEN, H.*et al.* Association between ghrelin gene variations and blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance. **Am J Hypertens**, v.19, p.920–926, 2006.

MAHLEY, R.; RALL, S. Type III hyperlipoproteinemia (dysbeta-lipoproteinemia): the role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. p. 2835, New York, 2001.

MALAVASI, E.L.; KELLY, V.; NATH, N.; GAMBINERI, A.; DAKIN, R.S.; PAGOTTO, U.; PASQUALI, R.; WALKER, B.R.; CHAPMAN, K.E. Functional effects of polymorphisms in the human gene encoding 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 beta-HSD1): a sequence variant at the translation start of 11 beta-HSD1 alters enzyme levels. **Endocrinology**, v.151, p.195-202, 2010.

MANCIA, G.; BOMBELLI, M.; CORRAO, G.; FACCHETTI, R.; MADOTTO, F.; GIANNATTASIO, C.; TREVANO, F.Q.; GRASSI, G.; ZANCHETTI, A.; SEGA, R. Metabolic syndrome in the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni (PAMELA) study: daily life blood pressure, cardiac damage, and prognosis. **Hypertension**, v.49, p.40-47, 2007.

MARCINIAK, S. J.; RON, D. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. **Physiol.Rev**, v.86, p.1133–1149, 2006.

MARINI, H.; BITTO, A.; ALTAVILLA, D.; BURNETT, B.P.; POLITO, F.; DI STEFANO, V.; MINUTOLI, L.; ATTERITANO, M.; LEVY, R.M.; D'ANNA, R. H. *et al.* Breast safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: a follow-up study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p.4787–4796, 2008.

MARINI, H.; BITTO, A.; ALTAVILLA, D.; BURNETT, B.P.; POLITO, F.; DI STEFANO, V.; MINUTOLI, L.; ATTERITANO, M.; LEVY, R.M.; FRISINA, N.H. *et al.* Efficacy of genistein aglycone on some cardiovascular risk factors and homocysteine levels: a follow-up study. **Nut Metab Cardiovasc Dis**, v. 20, p. 332–340, 2010.

MARINESCU, V.D.; KOHANE, I.S.; RIVA, A. MAPPER: a search engine for the computational identification of putative transcription factor binding sites in multiple genomes. **BMC Bioinformatics**, v.6, p.79, 2005.

MASUZAKI, H.; PATERSON, J.; SHINYAMA, H.; MORTON, N.M.; MULLINS, J.J.; SECKL, J.R.; FLIER, J.S. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. **Science**, v. 294, p.2166 –2170, 2001.

MATSUZAWA, Y.; SHIMOMURA, I.; NAKAMURA, T.; KENO, Y.; KOTANI, K.; TOKUNAGA, K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. **Obes.Res.** v.2, p.187S–194S, 1995.

MAYER-DAVIS, E. J.; MONACO, J.H.; HOEN, H.M.; CARMICHAEL, S.; VITOLINS, S.V.; REWERS, J.M.; HAFFNER, S.M.; AYAD, M.F.; BERGMAN, KARTER, A.J. Dietary fat and insulin sensitivity in a triethnic population: the role of obesity. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). **American Journal Clinical Nutritional**, v.65, p.79 – 87, 1997.

MCTERNAN, P.G.; MCTERNAN, C.L.; CHETTY, R.; JENNER, K.; FISHER, F.M.; LAUER, M.N.; CROCKER, J.; BARNETT, A.H.; KUMAR, S. Increased resistin gene

and protein expression in human abdominal adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.2407-2410, 2002.

MEDICI, F.; HAWA, M.; IANARI, A.; PYKE, D.A.; LESLIE, R.D. Concordance rate for type 2 diabetes mellitus in monozygotic twins: actuarial analysis. **Diabetologia**, v.42, p.146-150, 1999.

MELISTAS, L.; MANTZOROS, C.S.; KONTOGIANNI, M.; ANTONOPOULOU, S.; ORDOVAS, J.M.; YIANNAKOURIS, N. Association of the +45T>G and +276G>T polymorphisms in the adiponectin gene with insulin resistance in nondiabetic Greek women. **Eur J Endocrinol**, v.161, p.845-852, 2009.

MENDES, R. A.; LEITE, N. Ginástica Laboral: princípios e aplicações práticas. 3. Barueri-SP: Manole, 2012.

MEYER, K. A.; KUSHI, L.H.; JACOBS D. R.; FOLSOM, A. R. Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. **Diabetes Care**, v.24, p.1528 – 1535, 2001.

MILLER, V.M.; RECKELHOFF, J.F.; SIECK, G.C. Physiology's Impact: Stop Ignoring the Obvious-SEX MATTERS! **Physiology**, v.29, p.4-5, 2014.

MILLS, G.W.; AVERY, P.J.; MCCARTHY, M.I.; HATTERSLEY, A.T.; LEVY, J.C.; HITMAN, G.A.; SAMPSON, M.; WALKER, M. Heritability estimates for beta cell function and features of the insulin resistance syndrome in UK families with an increased susceptibility to type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.47, p.732–738, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Atenção Básica à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes mellitus. Cadernos de Atenção Básica n. 16; 2006.

MITSUI, T.; SHIMAOKA, K.; TSUZUKU, S.; KAJIOKA, T.; SAKAKIBARA, H. Pedometer determined physical activity and indicators of health in Japanese adults. **J Physiol Anthropol**. v. 27, n. 4, p. 179-84, 2008.

MONDER, C.; SHACKLETON, C.H. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase: fact or fancy? **Steroids**, v. 44, p. 383– 417, 1984.

MONTAGUE, C.T.; O'RAHILLY, S. The pearls of portiness: causes and consequences of visceral adiposity. **Diabetes**, v.49, p.883, 2000.

MOON, S.S.; LEE, Y.S.; KIM, J.G.; KIM, S.W.; JEONG, J.Y.; JEON, E.J.; SEO, H.A.; KWAK, S.H.; PARK, K.S.; LEE, I.K. Relationship of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and hexose-6-phosphate dehydrogenase gene polymorphisms with metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Endocrine Journal**, v. 58, p.949-959, 2011.

MORALES, M.A.; CARVAJAL, C.A.; ORTIZ, E.; MOSSO, L.M.; ARTIGAS, R.A.; FARDELLA, C.E. Possible pathogenetic role of 11 α -hydroxysteroid dehydrogenase

type 1 (11_HSD1) gene polymorphisms in arterial hypertension. **Rev Med Chil** v.136, p.701–71, 2008.

MORTON, N.M.; HOLMES, M.C.; FIEVET, C.; STAELS, B.; MULLINS, J.J.; SECKL, J.R. Improved lipid and lipoprotein profile, hepatic insulin sensitivity and glucose tolerance in 11 -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 null mice. **J Biol Chem**, v.276, p.41293– 41300, 2001.

MOTTAGUI-TABAR, S.; RYDEN, M.; LOFGREN, P.; FAULDS, G.; HOFFSTEDT, J.; BROOKES, A.J.; ANDERSSON, I.; ARNER, P. Evidence for an important role of perilipin in the regulation of human adipocyte lipolysis. **Diabetologia**, v.46, p.789–797, 2003.

MULÈ, G.; CALCATERRA, I.; NARDI, E.; CERASOLA, G.; COTTONE, S. Metabolic syndrome in hypertensive patients: An unholy Alliance. **World J Cardiol** , v.6, p.890-907, 2014.

MUOIO, D.M.; NEWGARD, C.B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v.9, p.193–205, 2008.

MURPHY, R.; ELLARD, S.; HATTERSLEY, A.T. Clinical implication of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. **Nat Clin Pract Endocrinol Metabolic**, v.4; p.200-213, 2008.

NAGASE, T.; KIKUNO, R.; OHARA, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. The complete sequences of 60 new cDNA clones from brain which code for large proteins. **DNA Res**, v.8, p.179-187, 2001.

NAIR, S.; LEE, Y.H.; LINDSAY, R.S.; WALKER, B.R.; TATARANNI, P.A.; BOGARDUS, C.; BAIER, L.J.; PERMANA, P.A. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: genetic polymorphisms are associated with type 2 diabetes in Pima Indians independently of obesity and expression in adipocyte and muscle. **Diabetologia**, v. 47, p.1088–1095, 2004.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, dbSNP – SHORT GENETIC INFORMATION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=849610> e <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs12086634>>. Acesso em 09/01/2015.

NAKANO, Y.; TOBE, T.; CHOI-MIURA, N.H.; MAZDA, T.; TOMITA, M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin binding protein purified from human plasma. **J Biochem**, v.120, p.803–812, 1996.

NAKAZATO, M.; MURAKAMI, N.; DATE, Y.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; KANGAWA, K.; MATSUKURA, S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v.409, p.194–198, 2001.

NAVAB, M.; ANANTHARAMAIAH, G.M.; FOGELMAN, A.M. The role of high-density lipoprotein in inflammation. **Trends Cardiovasc. Med**, v.15, p.158–161, 2005.

NAWROCKI, A.R.; SCHERER, P.E. The delicate balance between fat and muscle: adipokines in metabolic disease and musculoskeletal inflammation. **Current Opinion in Pharmacology**, v.4, p.281–289, 2004.

NEDERGAARD, J.; CANNON, B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. **Cell Metab**, v.11, p.268-272, 2010.

NETO, M.A.; RASCADO, R.R.; BENDHACK, L.M. Receptores β -adrenérgicos no sistema cardiovascular. In: X SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR, 39., 2006, Ribeirão Preto.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B.; GRAETZ, N.; MARGONO, C.; MULLANY, E.C.; BIRYUKOV, S.; ABBAFATI, C.; ABERA, S.F.; ABRAHAM, J.P.; ABU-RMEILEH, N.M. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, v. 384, p. 766 - 781, 2014.

NISHIU, J.; TANAKA, T.; NAKAMURA, Y. Isolation and chromosomal mapping of the human homolog of perilipin (PLIN), a rat adipose tissue-specific gene, by differential display method. **Genomics**, v.48, p.254–257, 1998.

NISHIZAWA, H.; SHIMOMURA, I.; KISHIDA, K.; MAEDA, N.; KURIYAMA, H.; *et al.* Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*, v.51, p.2734-41, 2002.

NOLAN, C.J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, v. 378, p. 169-181, 2011.

O'DEA, K. Westernisation, insulin resistence and diabetes in Australian aborigines. **Med J Aust**, v.155, p.258-264, 1991.

O'RAHILLY, S. Human genetics illuminates the paths to metabolic disease. **Nature**, v.462, p.307-314, 2009.

ODAWARA, M.; SASAKI, K.; YAMASHITA, K. β 3-adrenergic receptor gene variant and Japanese NIDDM: a pitfall in meta-analysis. **Lancet**, v.348, p.896-897, 1996.

OGURI, K.; TACHI, T.; MATSUOKA, T. Visceral fat accumulation and metabolic syndrome in children: the impact of Trp64Arg polymorphism of the beta3- adrenergic receptor gene. **Acta Pædiatrica**, v.102, p. 613–619, 2013.

ORDOVÁS, J.M. Gender, a significant factor in the cross talk between genes, environment, and health. **Gend Med.**, v.4 Suppl B:S111-22, 2007.

Organização Mundial da Saúde. Health topics – Cardiovascular Disease. Disponível em <http://www.who.int/topics/cardiovascular_diseases/en/> Acesso em 10/12/2014.

OMIM –Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em <<http://omim.org/entry/109690>>. Acesso em 12/12/2014.

Organização Mundial da Saúde. Health topics – Obesity. Disponível em <<http://www.who.int/topics/obesity/en/>> Acesso em 10/12/2014.

OSTBYE, T.; WELBY, T.J.; PRIOR, I.A.; SALMOND, C.E.; STOKES, Y.M. Tipe 2 (non-insuline dependent) diabetes mellitus migration and westernization: the Tokelau Island Migrant Study. **Diabetologia**, v.32, p.585-590, 1989.

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; NISHIDA, M.; MATSUYAMA, A.; OKAMOTO, Y.; ISHIGAMI, M.; KURIYAMA, H.; KISHIDA, K.; NISHIZAWA, H.; HOTTA, K.; MURAGUCHI, M.; OHMOTO, Y.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. **Circulation**, v.103, p.1057-1063, 2001.

PALANIAPPAN, L.; CARNETHON, M.R.; WANG, Y.; HANLEY A.J.; FORTMANN, S.P.; HAFFNER, S.M.; WAGENKNECHT, L. Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. **Diabetes Care**, v. 27, p. 788–793, 2004.

PALIK, E.; BARANYI, E.; MELCZER, Z.; AUDIKOVSKY, M.; SZOCS, A. *et al.* Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. **Diabetes Res Clin Pract**, v.76, p.351–357, 2007.

PANNIER, B.; THOMAS, F.; BEAN, K.; JÉGO, B.; BENETOS, A.; GUIZE, L. The metabolic syndrome: similar deleterious impact on all-cause mortality in hypertensive and normotensive subjects. **J Hypertens**, v.26, p.1223-1228, 2008.

PAREKH, P.J.; ARUSI, E.; VINIK, A.I.; JOHNSON, D.A. The role and influence of gut microbiota in pathogenesis and management of obesity and metabolic syndrome. **Front Endocrinol**, v.5, p. 1-7, 2014.

PARILLO, M.; RIVELLESE, A.; CIARDULLO, A.V.; CAPALDO, B.; GIACCO, A.; GENOVESE, S.; RICCARDI, G. A high monounsaturated fat/low carbohydrate diet improves peripheral insulin sensitivity in non insulin dependent diabetic patients. **Metabolism**, v.41, p.1373–1378, 1992.

PARK, T.S.; HU, Y.; NOH, H.L.; DROSATOS, K.; OKAJIMA, K.; BUCHANAN, J.; TUINEI, J.; HOMMA, S.; JIANG, X.C.; ABEL, E.D.; *et al.* Ceramide is a cardiotoxin in lipotoxic cardiomyopathy. **J. Lipid Res**, v.49, p.2101–2112, 2008.

PEREIRA, T.V.; MINGRONI-NETTO, R.C.; YAMADA, Y. ADRB2 and LEPR gene polymorphisms: synergistic effects on the risk of obesity in Japanese. **Obesity**, v.19, p.1523–1527, 2011.

PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v.90, p. 11G-18G, 2002.

PHILLIPS, C.; LOPEZ-MIRANDA, J.; PEREZ-JIMENEZ, F.; MCMANUS, F.; ROCHE, H.M. Genetic and nutrient determinants of the metabolic syndrome. **Current Opinion Cardiology** v.21, p.185 – 193, 2006.

PHILLIPS, C.M.; GOUMIDI, L.; BERTRAIS, S.; FIELD, M. R.; CUPPLES, A.; ORDOVAS, J.M.; DEFOORT, C.; LOVEGROVE, J.A.; DREVON, C.A.; GIBNEY, M.J.; BLAAK, E.E.; KIEC-WILK, B.; KARLSTROM, B.; LOPEZ-MIRANDA, J.; MCMANUS, R.; HERCBERG, S.; LAIRON, D.; PLANELLS, R.; ROCHE, H.M. Gene-nutrient interactions with dietary fat modulate the association between genetic variation of the ACSL1 gene and metabolic syndrome. **Journal of Lipid Research**, v.51, p.1793-1800, 2010.

PIERCE, M.; KEEN, H.; BRADLEY, C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. **Diabet Med**, v.12, p.6-13, 1995.

POLLITZER, E. Cell sex matters. **Nature**, v. 500, p.23-24, 2013

POLLIN, T.I.; TANNER, K.; O'CONNELL, J.R.; OTT, S.H.; DAMCOTT, C.M.; SHULDINER, A.R.; MCLENITHAN, J.C.; MITCHELL, B.D. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the ADIPOQ gene. **Diabetes**, v.54, p.268–74, 2005.

PONHOLZER, A.; TEMML, C.; RAUCHENWALD, M.; MARSZALEK, M.; MADERSBACHER, S. Is the metabolic syndrome a risk factor for female sexual dysfunction in sexually active women? **International Journal of Impotence Research**, v. 20, p.100–104, 2008.

POULSEN, P.; GRUNNET, L.G.; PILGAARD, K.; STORGAARD, H.; ALIBEGOVIC, A.; SONNE, M.P.; CARSTENSEN, B.; BECK-NIELSEN, H.; VAAG, A. Increased risk of type 2 diabetes in elderly twins. **Diabetes**, v.58, p. 1350-1355, 2009.

POVEL, C.M.; BOER, J.M.A.; REILING, E.; FESKENS, E.J.M. Genetic variants and the metabolic syndrome: a systematic review. **Obesity reviews**, 2011.

PRENTKI, M.; NOLAN, C.J. Islet β cell failure in type 2 diabetes. **Journal Clinical Investigation**, v.116, p.1802-1812, 2006.

QI, L.; CORELLA, D.; SORLÍ, J.V.; PORTOLÉS, O.; SHEN, H.; COLTELL, O.; GODOY, D.; GREENBERG, A.S.; ORDOVAS, J.M. Genetic variation at the perilipin (PLIN) locus is associated with obesity-related phenotypes in white women. **Clin Genet**, v.66, p.299–310, 2004a.

QI, L.; SHEN, H.; LARSON, I.; SCHAEFER, E.J.; GREENBERG, A.S.; TREGOUET, D.A.; CORELLA, D.; ORDOVAS, J.M. Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population. **Obes Res**, v.12, p.1758–1765, 2004b.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T. *et al.* A human gut microbial

gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, v. 464, p.59-65, 2010.

RANDAZZO DE MOURA, P.; VIDAL, F.A.P. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. **Scientia Medica**, v. 21, p. 31-36, 2011.

RANDLE, P.J.; KERBEY, A.L.; ESPINAL, J. Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. **Diabetes Metab Rev**, v.4, p. 623-38, 1988.

RANDLE, P.J. Mechanism modifying glucose oxidation in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.37, p.155-161, 1994.

RASK, E.; OLSSON, T.; SOˆDERBERG, S.; ANDREW, R.; LIVINGSTONE, D.E.; JOHNSON, O.; WALKER, B.R. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.1418 –1421, 2001.

REAVEN, G.M. Role of Insulin Resistance in Human. **Diabetes**, v. 37, p.1595-1607, 1988.

REIHSANUS, E.; INNIS, M.; MACINTYRE, N.; LIGGETT, S.B. Mutations in the gene encoding for b2-adrenergic receptor in normal and asthmatic subjects. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 8, p.334–339, 1993.

REILLY, M.P.; RADER, D.J. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? **Circulation**, v. 108, p.1546– 1551, 2003.

REYNISDOTTIR, S.; WAHRENBERG, H.; CARLSTROM, K.; ROSSNER, S.; ARNER, P. Catecholamine resistance in fat cells of women with upper-body obesity due to decreased expression of beta 2-adrenoceptors. **Diabetologia** , v.37, p. 428 – 435, 1994.

RICCARDI, G.; GIACCOB, R.A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. **Rivellesea Clinical Nutrition**.v.23, p.447–456, 2004.

RICH SS. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. **Diabetes**, v.39, p.1315–1319, 1990.

RICHARDSON, K.; LOUIE-GAO, Q.; ARNETT, D.K.; PARNELL, L.D.; LAI, C.Q.; DAVALOS, A.; FOX, C.S.; DEMISSIE, S.; CUPPLES, L.A.; FERNANDEZ-HERNANDO, C.; ORDOVAS, J.M. The PLIN4 Variant rs8887 Modulates Obesity Related Phenotypes in Humans through Creation of a Novel miR-522 Seed Site. **PLOS ONE**, v.6, e17944, 2011.

RISSANEN, J.; KUOPUSJARVI, M.; PIHLAJAMAKI, J.; SIPILAINEN, R.; HEIKKINEN, S.; VANHALA, M.; KEKALAINEN, P.; KUUSISTO, J.; LAASKO, M. The Trp64Arg polymorphism of the b3-adrenergic receptor gene. Lack of association with NIDDM and features of insulin resistance syndrome. **Diabetes Care**, v.20, p.1319-1323, 1997.

ROCHE, H.M.; PHILLIPS, C.; GIBNEY, M.J. The metabolic syndrome: the crossroads of diet and genetics. **Proc Nutr Soc**, v.64, p. 371–377, 2005.

RODRIGUES, M.N.; SILVA, S.C.; MONTEIRO, W.D.; FARINATTI, P.T. V. Estimativa da gordura corporal através de equipamentos de bioimpedância, dobras cutâneas e pesagem hidrostática Rev. Bras. Med. Esporte. v. 7, p.1517-8692, 2001.

SAKANE, N.; YOSHIDA, T.; UMEKAWA, T.; KOGURE, A.; KONDO, M. Beta2-adrenoceptor gene polymorphism and obesity. **Lancet**, v. 353, p. 1976, 1999.

SAKANE, N.; YOSHIDA, T.; UMEKAWA, T.; KOGURE, A.; TAKAKURA, Y.; KONDO, M. Effects of Trp64Arg mutation in the β_3 -adrenergic receptor gene on weight loss, body fat distribution, glycemic control, and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 20, p.1887–1890, 1997a.

SAKANE, N.; YOSHIDA, T.; UMEKAWA, T.; KONDO, M.; SAKAI, Y.; TAKAHASHI, T. β_3 -Adrenergic-receptor polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome. **Diabetologia**, v.40, p.200–204, 1997b.

SALBE, A.D.; TSHOP, M.H.; DELPARIGI, A.; VENTI, C.; TATARANNI, P.A. Negative relationship between fasting plasma ghrelin concentrations and ad libitum food intake. **J Clin Endocrinol Metabol**, v.89, p.2951-2956, 2004.

SALEH, A.A.; CREPOSTNAIA, D.; MANIOU, Z.; LEWIS, F.J.; HALL, W.L.; SANDERS, T.A.B.; O DELL, S.D.; ON BEHALF OF THE MARINA STUDY TEAM. Adiponectin Gene Variant Interacts with Fish Oil Supplementation to Influence Serum Adiponectin in Older Individuals. **J. Nutr**, v.143, p.1021–1027, 2013.

SAUNDERS, T.J.; PALOMBELLA, A.; MCGUIRE, K.A.; JANISZEWSKI, P.M.; DESPRÉS, J.P.; ROSS, R. Acute exercise increases adiponectin levels in abdominally obese men. **J Nutr Metab**, v.2012, p.1-6, 2012.

SAXENA, R.; HIVERT, M.F.; LANGENBERG, C.; TANAKA, T.; PANKOW, J.S.; VOLLENWEIDER, P.; LYSSSENKO, V.; BOUATIA-NAJI, N.; DUPUIS, J.; JACKSON, A.U. *et al.* Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. **Nature Genetic**, v.42, p.142-148, 2010.

SCHERER, P.E.; BICKEL, P.E.; KOTLER, M.; LODISH, H.F. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. **Nat Biotechnol**, v.16, p.581–586, 1998.

SCHERER, P.E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G.; LODISH, H.F. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem**, v.270, p.26746–26749, 1995.

SCHIFFELERS, S.L.; SARIS, W.H.; BOOMSMA, F.; VAN BAAK, M.A. β_1 - and β_2 -Adrenoceptor-mediated thermogenesis and lipid utilization in obese and lean men. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.2191 – 2199, 2001.

SCHILLACI, G.; PIRRO, M.; VAUDO, G.; GEMELLI, F.; MARCHESI, S.; PORCELLATI, C.; MANNARINO, E. Prognostic value of the metabolic syndrome in essential hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v.43, p. 1817-1822, 2004.

SCHOLZE, J.; ALEGRIA, E.; FERRI, C.; LANGHAM, S.; STEVENS, W.; JEFFRIES, D.; UHL-HOCHGRAEBER, K. Epidemiological and economic burden of metabolic syndrome and its consequences in patients with hypertension in Germany, Spain and Italy; a prevalence-based model. **BMC Public Health**, v.10, p. 529, 2010.

SCHOONJANS, K.; STAELS, B.; AUWERX, J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. **Journal of lipid research**, v. 37, p.907–925, 1996.

SECKL, J. R.; WALKER, B. R. **Endocrinology**, v.142, p.1371, 2001.

SECKL, J.R.; MORTON, N.M.; CHAPMAN, K.E.; WALKER, B.R. Glucocorticoids and 11-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. **Recent Prog Horm Res** v. 59, p.359 –393, 2004.

SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**, v.87, p.4–14, 2010.

SHEN J, GOYAL A, SPERLING L. The emerging epidemic of obesity, diabetes, and the metabolic syndrome in china. **Cardiol Res Pract**, v. 2012, p.1-5, 2012.

SIITERI, P.K.; MURAI, J.T.; HAMMOND, G.L.; NISKER, J.A.; RAYMOURE, W.J.; KUHN, R.W. The serum transport of steroid hormones. **Recent Prog Horm Res**. v.38, p. 457–510, 1982.

SKOLNIK, N.S.; RYAN, D.H. Pathophysiology, Epidemiology, and Assessment of Obesity in Adults. **J Fam Pract**, v. 63, p. s3-s10, 2014.

SLADECK, R.; ROCHELEAU, G.; RUNG, J.; DINA, C.; SHEN, L.; SERRE, D.; BOUTIN, P.; VINCENT, D.; BELISLE, A.; HADJADJ, S. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v.445, p.881-885, 2007.

SMITH, C.E.; ORDOVÁS, J.M. Update on perilipin polymorphisms and obesity. **Nutrition Reviews**, v.70, p.611–621, 2012.

SNIJDER, M.B.; ZIMMET, P.Z.; VISSER, M.; DEKKER, J.M.; SEIDELL, J.C.; SHAW, J.E. Independent and opposite associations of waist and hip circumferences with diabetes, hypertension and dyslipidemia: the AusDiab Study. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28, p. 402–409, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA ESTUDOS DA OBESIDADE. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq.bras. Cardiol**, v.84, p.3-28, 2005.

SONE, Y.; YAMAGUCHI, K.; FUJIWARA, A.; KIDO, T.; KAWAHARA, K.; ISHIWAKI, A.; KONDO, K.; MORITA, Y.; TOMINAGA, N.; OTSUKA, Y. Association of lifestyle factors, polymorphisms in adiponectin, perilipin and hormone sensitive lipase, and clinical markers in Japanese males. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.56, p.123-130, 2010.

SÖNMEZ, K.; AKÇAKOYUN, M.; AKÇAY, A.; DEMİR, D.; DURAN, N.E.; GENÇBAY, M.; DEĞERTEKİN, M.; TURAN, F. Which method should be used to determine the obesity, in patients with coronary artery disease? (Body mass index, waist circumference or waist-hip ratio). **Int J Obes**, v.27, p.341-346, 2003.

SONNENBURG, E.D.; ZHENG, H.; JOGLEKAR, P.; HIGGINBOTTOM, S.K.; FIRBANK, S.J.; BOLAM, D.N.; SONNENBURG, J.L. Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. **Cell**, v.141, p.1241-1252, 2010.

SORO-PAAVONEN, A.; WATSON, A.M.; LI, J.; PAAVONEN, K.; KOITKA, A.; CALKIN, A.C.; BARIT, D.; COUGHLAN, M.T.; DREW, B.G.; LANCASTER, G.I.; *et al.* Receptor for advanced glycation end products (RAGE) deficiency attenuates the development of atherosclerosis in diabetes. **Diabetes**, v.57, p. 2461-2469, 2008.

SRINIVAS, M.; SRINIVASAN, V.; MOHAN, M.B.; VARGHESE, J.; VENKATARAMAN, J.A study of gender-wise risk association between fatty liver and metabolic syndrome components (Asia-Pacific criteria) in a South Indian urban cohort. **Indian J Gastroenterol**, 2015. [Epub ahead of print]

STAIANO, A.E.; KATZMARZYK, P.T. Ethnic and sex differences in body fat and visceral and subcutaneous adiposity in children and adolescents. **Int J Obes**, v.36, p. 1-9, 2012.

STANHOPE, K.L.; SCHWARZ, J.M.; HAVEL, P. Adverse metabolic effects of dietary fructose: results from the recent epidemiological, clinical and mechanistic studies. **Curr Opin Lipidol**, v.24, p.198-206, 2013.

STEINLE, N.I.; POLLIN, T.I.; O'CONNELL, J.R.; MITCHELL, B.D.; SHULDINER, A.R. Variants in the ghrelin gene are associated with metabolic syndrome in the old order amish. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, p.6672-6677, 2005.

STENVINKEL, P. Obesity - a disease with many aetiologies disguised in the same oversized phenotype: has the overeating theory failed? **Nephrol Dial Transplant**, [Epub ahead of print], 2014.

STEWART, P.M.; TOMLINSON, J.W. Cortisol, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, p.94-95, 2002.

STORLIEN, L.H.; BAUR, L.A.; KRIKETOS, A.D.; PAN, D.A.; COONEY, G.J.; JENKINS, A.B.; CALVERT, G.D.; CAMPBELL, L.V. Dietary fats and insulin action. **Diabetologia**, v.39, p.621 - 631, 1996.

STORLIEN, L.H.; JENKINS, A.B.; CHISHOLM, D.P.; PASCOE, W.S.; KRAEGEN, E.W. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats:

relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipids. **Diabetes**, v. 40, p.280–289, 1991.

STRATFORD, S.; HOEHN, K.L.; LIU, F.; SUMMERS, S. A. Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. **J. Biol. Chem**, v.279, p.36608–36615, 2004.

STROSBERG, A.D.; PIETRI-REUXEL, F. Function and regulation of the β 3-adrenoceptor. **Trends Pharmacol Sci**, v. 17, p.373-381, 1996.

STROSBERG, A.D. Association of β 3-adrenoceptor polymorphism with obesity and diabetes: current status. **Trends Pharmac Sci**, v.18, p. 449 – 454, 1997.

SUBRAMANIAN, S.; HAN, C.Y. CHIBA, T.; MCMILLEN, T.S.; WANG, S.A.; HAW III, A.; KIRK, E.A.; O'BRIEN, K.; CHAIT, A. Dietary cholesterol worsens adipose tissue macrophage accumulation and atherosclerosis in obese LDL receptor-deficient mice. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v.28, p.685–691, 2008.

SUPLICY, H. L. Obesidade visceral, resistência a insulina e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.2, p.136-141, 2000.

SZABO DE EDELENYI, F.; GOUMIDI, L.; BERTRAIS, S.; PHILLIPS, C.; MACMANUS, R.; ROCHE, H.; PLANELLS, H.; LAIRON, D. Prediction of the metabolic syndrome status based on dietary and genetic parameters, using Random Forest. **Genes Nutr**. v.3, p.173–176, 2008.

TAGHIBIGLOU, C. *et al.* Mechanisms of hepatic very low density lipoprotein overproduction in insulin resistance. Evidence for enhanced lipoprotein assembly, reduced intracellular ApoB degradation, and increased microsomal triglyceride transfer protein in a fructose-fed hamster model. **J. Biol. Chem**. v.275, p.8416–8425, 2000.

TAI, E.S.; ORDOVAS, J.M. The role of perilipin in human obesity and insulin resistance. **Curr Opin Lipidol**, v.18, p.152–156, 2007.

TAKAHASHI, M.; ARITA, Y. *et al.* Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.24, p.861-868, 2000.

TANAKA, M.; NARUO, T.; NAGAI, N.; KUROKI, N.; SHIYA, T.; NAKAZATO, M.; MATSUKURA, S.; NOZOE, S. Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. **J Psychiatr Res**, v.37, p.17-22, 2003.

TANIMURA, D.; SHIBATA, R.; IZAWA, H.; HIRASHIKI, A.; ASANO, H.; MURASE, Y.; MIYATA, S.; NAKATOCHI, M.; OUCHI, N.; ICHIHARA, S.; *et al.* Relation of a common variant of the adiponectin gene to serum adiponectin concentration and metabolic traits in an aged Japanese population. **Eur J Hum Genet**, v.19, p.262-269, 2011.

TANNIN, G.M.; AGARWAL, A.K.; MONDER, C.; NEW, M.I.; WHITE, P.C. The human gene for 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase: structure, tissue distribution, and chromosomal localization. **J Biol Chem**, v.266, p.16653-16658, 1991.

TANSEY, J.T.; SZTALRYD, C.; GRUÍA-GRAY, J.; ROUSH, D.L.; ZEE, J.V.; GRAVILOVA, O.; REITMAN, M.L.; DENG, C.X.; LI, C.; KIMMEL, A.R.; LONDOS, C. Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98, p.6494–6499, 2001.

TANSEY, J.T.; SZTALRYD, C.; HLAVIN, E.M.; KIMMEL, A.R.; LONDOS, C. The Central Role of Perilipin A in Lipid Metabolism and Adipocyte Lipolysis. **Life**, v.56, p.379–385, 2004.

TATTERSAL, R.B.; FAJANS, S.S. Prevalence of diabetes and glucose intolerance in 199 offspring of thirty-seven conjugal diabetic parents. **Diabetologia**, v.24, p.452-462, 1975.

TAYLOR, M.R.G.; BRISTOW, M.R. The Emerging Pharmacogenomics of the Beta-Adrenergic Receptors. **Medscape**, v.10, 2004.

TCHERNOF, A.; STARLING, R.D.; TURNER, A.; SHULDINER, A.R.; WALSTON, J.D.; SILVER, K.; POEHLMAN, E.T. Impaired capacity to lose visceral adipose tissue during weight reduction in obese postmenopausal women with the Trp64Arg beta3-adrenoceptor gene polymorphism. **Diabetes**, v.49, 1709–1713, 2000.

THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP), Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) final report. **Circulation**, v.106, p. 3143–3421, 2002.

TILG, H.; KASER, A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. **The J Clin Invest**, v.121, p.2126-2132, 2011.

TIMOSSI, L. S.; PEDROSO, B.; PILATTI, L. A.; FRANCISCO, A. C. Adaptação do modelo de Walton para avaliação da qualidade de vida no trabalho. *Educação Física/UEM*. v. 20, n. 3, p. 395-405, 2009.

TIMOSSI, L.S. Passos diários, obesidade visceral, espessamento da carótida, qualidade de vida e autoeficácia em trabalhadores. 122 f. Tese (Doutorado em Educação Física) – Departamento de Educação Física, Núcleo de Qualidade de Vida, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

TOMA, I.; KANG, J.J.; SIPOS, A.; VARGAS, S.; BANSAL, E.; HANNER, F.; MEER, E.; PETI-PETERDI, J. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and rennin release in murine and rabbit kidney. **J. Clin. Invest**, v.118, p.2526–2534, 2008.

TOMAS, E.; TSAO, T.S.; SAHA, A.K.; MURREY, H.E.; ZHANG, C.C.; ITANI, S.I.; LODISH, H.F.; NEIL, B. Ruderman Enhanced muscle fat oxidation and glucose

transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, p.16309–16313, 2002.

TOMASZEWSKI, M.; BRAIN, N.J.; CHARCHAR, F.J.; WANG, W.Y.; LACKA, B.; PADMANABAHN, S.; CLARK, J.S.; ANDERSON, N.H.; EDWARDS, H.V.; ZUKOWSKA-SZCZCHOWSKA, E.; GRZESZCZAK, W.; DOMINICZAK, A.F. Essential hypertension and beta2-adrenergic receptor gene: linkage and association analysis. **Hypertension**, v.40, p. 286–291, 2002.

TOMLINSON, J.W.; WALKER, E.A.; BUJALSKA, I.J.; DRAPER, N.; LAVERY, G.G.; COOPER, M.S.; HEWISON, M.; STEWART, P.M. 11-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. **Endocr Rev**, v.25, p.831– 866, 2004.

TRAN, T. T.; YAMAMOTO, Y.; GESTA, S.; KAHN, C. R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. **Cell Metabolism** v. 7, p.410–420, 2008.

TSCHOP, M.; SMILEY, D.L.; HEIMAN, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. **Nature**, v.407, p.908–913, 2000.

TSCHOP, M.; VISWANATH, D.; WEYER, C.; TATARANNI, P.A.; RAVUSSIN, E.; HEIMAN, M.L. Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. **Diabetes**, v.50, p.707–709, 2001.

TUDOR-LOCKE, C. Steps to Better Cardiovascular Health: How Many Steps Does It Take to Achieve Good Health and How Confident Are We in This Number? **Curr Cardiovasc Risk Rep**. v. 4, n. 4, p. 271-276, 2010.

TURNBAUGH, P.J.; BACKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J.I. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host Microbe**, v.3, p.213–223, 2008.

UKKOLA, O.; RAVUSSIN, E.; JACOBSON, P.; SNYDER, E.E.; CHAGNON, M.; SJOSTROM, L.; BOUCHARD, C. Mutations in the preproghrelin/ghrelin gene associated with obesity in humans. **J Clin Endocr Metab**, v.86, p.3996-3999, 2001.

V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.101, 2013.

VAN DAM, R. M.; WILLETT, W.C.; RIMM, E.B.; STAMPFER, M.J.; HU, F. B. Dietary fat and meat intake in relation to risk of type 2 diabetes in men. **Diabetes Care**, v.25, p. 417 – 424, 2002.

VAN DER LELY, A.F.; TSCHOP, M.; HEIMAN, M.L.; GHIGO, E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. **Endocrine Reviews**, v. 25, p.426–457, 2004.

VAN GAAL, L.F.; MERTENS, I.L.; DE BLOCK, C.E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. **Nature**, v.444, p.875–880, 2006.

VAN MARKEN; LICHTENBELT, W.D.; VANHOMMERIG, J.W.; SMULDERS, N.M.; DROSSAERTS, J.M.; KEMERINK, G.J.; BOUVY, N.D.; SCHRAUWEN, P.; TEULE, G.J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med**, v.360, p.1500-1508, 2009.

VERSCHOOR, L.; CHEN, Y.D.; REAVEN, E.P.; REAVEN, G.M. Glucose and fructose feeding lead to alterations in structure and function of very low density lipoproteins. **Horm. Metab. Res.** v.17, p.285-288, 1985.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 95, n. supl.1, p. 1-51, 2010.

VIDIGAL, F.C.; BRESSAN, J.; BABIO, N.; SALAS-SALVADÓ, J. Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, v.13, p.1-10, 2013.

VIENGCHAREUN, S.; ZENNARO, M.C.; PASCUAL-LE TALLEC, L.; LOMBES, M. Brown adipocytes are novel sites of expression and regulation of adiponectin and resistin. **FEBS Lett**, v.532, p.345-350, 2002.

VIGITEL BRASIL, 2013. Disponível em: <<http://biavati.files.wordpress.com/2014/05/vigitel-2013.pdf>>. Acesso em 28/12/2014.

VILELA JÚNIOR, G. B.; LEITE, N.; ALBUQUERQUE, A. M.; CAVAZZA, J. F.; SANTOS, T. K.; CIESLAK, F.; CHELUCHINHAK, A. B.; BRANCO, R. R. Qualidade de vida no trabalho: aferição da consistência interna e reprodutibilidade temporal do questionário QVS-80. 31º Simpósio Internacional de Ciências do Esporte. Brasília: **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**. 16: 130-130 p. 2008.

VISHRAM, J.K.K.; BORGLYKKE, A.; ANDREASEN, A.H.; JEPPESEN, J.; IBSEN, H.; JORGENSEN, T.; PALMIERI, L.; GIAMPAOLI, S.; DONFRANCESCO, C.; KEE F.; MANCIA, G.; CESANA, G.; KUULASMAA, K.; SALOMAA, V.; SANS, S.; FERRIERES, J.; DALLONGEVILLE, J.; SODERBERG, S.; ARVEILER, D.; WAGNER, A.; TUNSTALL-PEDOE, H.; DRYGAS, W.; OLSEN, M.H. Impact of Age and Gender on the Prevalence and Prognostic Importance of the Metabolic Syndrome and Its Components in Europeans. The MORGAM Prospective Cohort Project. **PLOS ONE**, v. 9, p. e107294, 2014.

VLACHOS, I. S.; HATZIIIOANNOU, A.; PERELAS, A.; PERREA, D. N. Sonographic assessment of regional adiposity. **Am J Roentgenol**. v. 189, n. 6, p. 1545-53, 2007.

VOIGHT, B.F.; SCOOT, L.J.; STEINTHORSDOTTIR, V.; MORRIS, A.P.; DINA, C.; WELCH, R.P.; ZEGGINI, E.; HUTH, C.; AULCHENKO, Y.S.; THORLEIFSSON, G.; *et al.* Twelve type 2 diabetes loci identified through large-scale association analysis. **Nature Genetic**, v.42, p.579-589, 2010.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev**, v.21, p.697-738, 2000.

WAJCHENBERG, B.L.; GIANNELLA-NETO, D.; DA SILVA, M.E.; SANTOS, R. F. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. **Horm.Metab. Res.**v.34, p.616–621, 2002.

WAJNRAJCH, M.; TEN, I.; GRETNER, J.M.; LEIBEL, R. Genomic organization of the human ghrelin gene. **The Journal of Endocrine genetics**, v.1, p. 231–233, 2000.

WALSTON, J.; SILVER, K.; BOGARDUS, C.; KNOWLER, W.C.; CELI, F.S.; AUSTIN, S.; MANNING, B.; STROSBURG, A.D.; STERN, M.P.; RABEN, N. *et al*. Time of onset of non-insulindependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. **N Engl J Med**, v.333, p.343– 347, 1995.

WANG, L.; FOLSOM, A.R.; ZHENG, Z.J.; PANKOW, J. S.; ECKFELDT, J.H. Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **American Journal Clinical Nutrition**, v.78, p.91 – 98, 2003

WANG, M.Y.; GRAYBURN, P.; CHEN, S.; RAVAZZOLA, M.; ORCI, L.; UNGER, R.H. Adipogenic capacity and the susceptibility to type 2 diabetes and metabolic syndrome. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.105, p.6139–6144 2008.

WARODOMWICHIT, D.; ARNETT, D.K.; KABAGAMBE, E.K. Polyunsaturated fatty acids modulate the effect of TCF7L2 gene variants on postprandial lipemia. **Journal Nutrition**, v.139, p.439–446, 2009.

WEYER, C.; FUNAHASHI, T.; TANAKA, S.; HOTTA, K.; MATSUZAWA, Y.; PRATLEY, R.E.; TATARANNI, P.A. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.1930 –1935, 2001.

WHITEHEAD, J.P.; RICHARDS, A.A.; HICKMAN, I.J.; MACDONALD, G.A.; PRINS, J.B. Adiponectin – a key adipokine in the metabolic syndrome. **Diabetes Obes Metab**, v.8, p.264–280, 2006.

WIDEN, E.; LEHTO, M.; KANNINEN, T.; WALSTON, J.; SHULDINER, A.R.; GROOP, L.C. Association of a polymorphism in the beta3- adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. **N Engl J Med**, v.333, p.348–351, 1995.

WILSON, P.W.F.; KANNEL, W.B.; SILBERSHATZ, H.; D'AGOSTINO, R. B. Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. **Arch Intern Med**, v. 159, p. 1104–1109, 1999.

WILSON, S.G.; ADAM, G.; LANGDOWN, M.; RENELAND, R.; BRAUN, A.; ANDREW, T.; SURDULESCU, G. L.; NORBERG, M. DUDBRIDGE, F.; REED, P. W.; SAMBROOK, P. N.; KLEYN, P.W.; SPECTOR T.D. Linkage and potential association of obesity-related phenotypes with two genes on chromosome 12q24 in a female dizygous twin cohort. **European Journal of Human Genetics**, V.14, P. 340–348, 2006.

WOLFRUM, C.; ASILMAZ, E.; LUCA, E.; FRIEDMAN, J.M.; STOFFEL, M. Regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. **Nature**, v.432, p.1027–1032, 2004.

WOLINS, N.E.; SKINNER, J.R.; SCHOENFISH, M.J.; TZEKOV, A.; BENSCH, K.G.; BICKEL, B.E. Adipocyte Protein S3-12 Coats Nascent Lipid Droplets. **J Biol Chem**, v. 278, p.37713–37721, 2003.

WYATT, H. R.; PETERS, J. C.; REED, G. W.; BARRY, M.; HILL, J. O. A Colorado statewide survey of walking and its relation to excessive weight. **Med Sci Sports Exerc**. v. 37, n. 5, p. 724-30, 2005.

XU, G.; SZTALRYD, C.; LU, X.; TANSEY, J.T.; GAN, J.; DORWARD, H.; KIMMEL, A.R.; LONDOS, C. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. **J Biol Chem**, v.280, p.42841–42847, 2005.

XU, L.L.; XIANG, H.D.; QIU, C.C; XU, Q. Association of ghrelin polymorphisms with metabolic syndrome in Han Nationality Chinese. **Biomed Environ Sci**, v.21, p. 188–192, 2008.

YAMADA, K.; ISHIYAMA-SHIGEMOTO, S.*et al.* Polymorphism in the 5'- eader cistron of the beta2-adrenergic receptor gene associated with obesity and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab** v.84, p.1754-1757, 1999.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; WAKI, H. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. **Nat Med**, v.7, p.941–6, 2001.

YOSHIDA, N.; NISHIMAKI, Y.; SUGIYAMA, M.; ABE, T.; TATSUMI, T.; TANOUE, A.; HIRASAWA, A.; TSUJIMOTO, G. SNP genotyping in the beta(2)-adrenergic receptor by electronic microchip assay, DHPLC, and direct sequencing. **J Hum Genet**, v. 47, p.500–503, 2002.

YOSHIDA, N.; SAKANE, N.; UMEKAWA, T. Mutation of beta-3-adrenergic receptor gene and response to treatment of obesity. **Lancet**, v. 346, p.1433– 1434, 1995.

YUSUF, S.; HAWKEN, S.; OUNPUU, S.; BAUTISTA, L.; FRANZOSI, M.G.; COMMERFORD, P.; LANG, C.C.; RUMBOLDT, Z.; ONEN, C.L.; LISHENG, L.; TANOMSUP, S.; WANGAI, P. JR.; RAZAK, F.; SHARMA, A.M.; ANAND, S.S.; INTERHEART STUDY INVESTIGATORS. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27,000 participants from 52 countries: a case–control study. **Lancet**, v.366, p.1640–1649, 2005.

ZEGGINI, E.; SCOTT, L.J.; SAXENA, R.; VOIGHT, B.F.; MARCHINI, J.L.; HU, T.; DE BAKKER, P.I.; ABECASIS, G.R.; ALMGREN, P.; ANDERSEN, G.; *et al.* Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. **Nature Genetic**, v.40, p.638-645, 2008.

ZHANG, H.; WU, J.; YU, L. Association of Gln27Glu and Arg16Gly Polymorphisms in Beta2-Adrenergic Receptor Gene with Obesity Susceptibility: A Meta-Analysis. **PLOS ONE**, v.9, 2014.

ZHAO, T.; ZHAO, J. Genetic effects of adiponectin on blood lipids and blood pressure. **Clin Endocrinol**, v.74, p.214–222, 2011.

APÊNDICE - METODOLOGIA

APÊNDICE

METODOLOGIA

ESTRUTURAÇÃO DO TRABALHO

O presente estudo constitui uma parceria entre o Departamento de Genética da UFPR (Laboratório de Polimorfismos e Ligação), e o Departamento de Educação Física da UFPR (Núcleo de Qualidade de Vida – NQV), o que possibilitou a integração de recursos materiais e intelectuais com a finalidade de estudar de maneira mais abrangente fenômenos biológicos complexos, como é o caso da síndrome metabólica.

O processo da coleta de material de material biológico e a obtenção das medidas antropométricas e de imagem foram realizadas no Núcleo de Qualidade de Vida do Departamento de Educação Física-UFPR. Parte do material biológico coletado foi processado no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética-UFPR, onde as análises genéticas foram realizadas, e outra parte foi processada no Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR para a obtenção das análises bioquímicas.

A partir da parceria descrita acima foi possível conceber um trabalho multidisciplinar que contou com a obtenção e análise de múltiplas variáveis, descritas no diagrama abaixo (FIGURA1A).

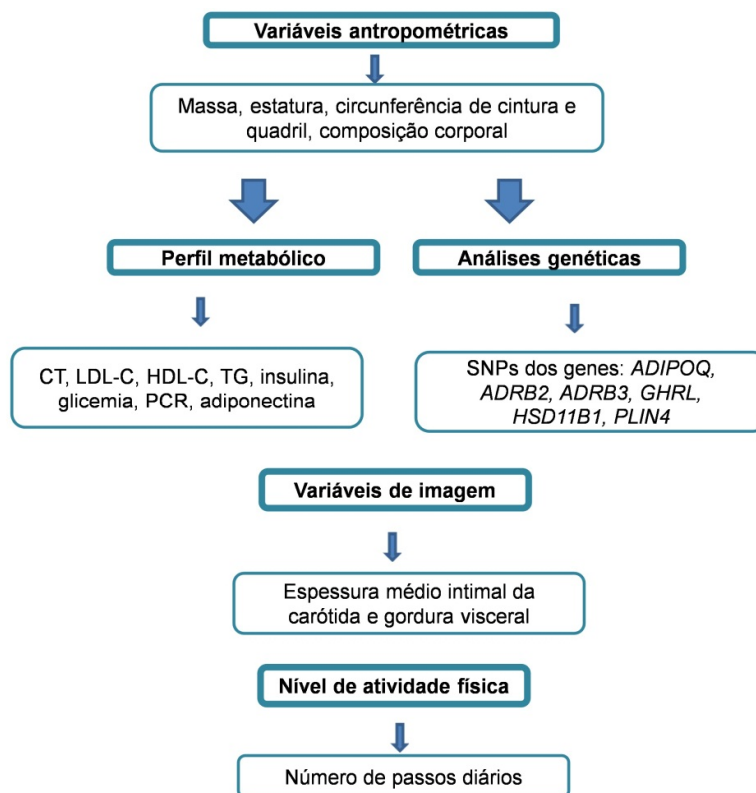


FIGURA 1A: DIAGRAMA DAS ETAPAS DO ESTUDO

NOTA: Colesterol total (CT); colesterol-lipoproteína de baixa densidade (LDL-C); colesterol-lipoproteína de alta densidade (HDL-C); triglicerídeos (TG); proteína C reativa (PCR).

AMOSTRA

A amostra foi constituída de trabalhadores da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram recrutados trabalhadores do Setor de Ciências Biológicas e do Setor de Ciências da Saúde, estes setores contam com 347 e 575 trabalhadores respectivamente, somando, portanto, uma população de 922 indivíduos.

A pesquisa foi divulgada a todos esses trabalhadores, e, tendo em vista que o objetivo era obter uma amostra representativa da população, nenhum critério de inclusão/exclusão específico foi aplicado, já que não havia o desejo de constituirmos grupos específicos com e sem patologias.

Contando apenas com a obrigatoriedade de ser servidor da UFPR, maior de 18 anos, e, aceitar participar de todas as etapas da pesquisa, concluímos o trabalho com 121 indivíduos aleatoriamente recrutados (35 homens e 86 mulheres), cuja

coleta de dados foi completa. No entanto, considerando uma maior aderência no início do projeto, amostras de sangue e dados antropométricos foram obtidos de um número maior de trabalhadores, como mostra a Tabela 1A, sendo que estes dados também foram analisados posteriormente.

TABELA 1A- DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS SEGUNDO OS DADOS OBTIDOS

Tipos de coleta/dados	Geral N	Homens (N)	Mulheres (N)
Sangue coletado	277	92	185
Dados genotípicos	277	92	185
Dados bioquímicos completos	123	36	87
Dados bioquímicos incompletos (pelo menos com perfil lipídico)	213	75	138
Dados antropométricos completos	121	35	86
Dados antropométricos incompletos (Pelo menos com IMC)	228	76	152
Conjunto de dados completos	121	35	86

Todos os participantes da pesquisa receberam esclarecimentos individuais a respeito dos objetivos, procedimentos utilizados, possíveis benefícios e riscos atrelados à execução do presente estudo, e condicionaram a sua participação de modo voluntário mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO1) (TIMOSSI, 2013), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná CEP/SD: 1159.084.11.06; CAAE 0082.0.091.000-11 (ANEXO 2).

5.3 INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS

5.3.1 Variáveis Antropométricas

Os procedimentos de obtenção das variáveis antropométricas seguiram o *Anthropometric Indicators Measurement Guide* (COGILL, 2003), e a descrição dos mesmos está na (TABELA 2A).

TABELA 2A – ESPECIFICAÇÕES DAS VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS UTILIZADAS NO ESTUDO

Variável	Unidade de medida	Instrumento usado	Especificações para a mensuração
Massa corporal	Kg (resolução de 100g)	balança (Filizola®)	Indivíduo em pé, descalço, com roupas leves
Estatura	m (escalonado em 0,1 cm)	estadiômetro (Sanny®)	Indivíduo descalço, calcanhares unidos, cabeça posicionada de acordo com o plano de Frankfurt, e a mensuração realizada em apnéia respiratória
IMC	IMC= massa kg/ altura m ²	Obtido a partir da massa e estatura	Classificação segundo (WHO, 2012): IMC < 18,5 baixo peso 18,5 ≤ IMC ≤ 24,9 adequado 25,0 ≤ IMC ≤ 29,9 sobrepeso 30,0 ≤ IMC ≤ 34,9 obesidade I 35,0 ≤ IMC ≤ 39,9 obesidade II IMC ≥ 40,0 obesidade III
Circunferência abdominal (CA)	cm (resolução de 0,1 mm)	fita flexível e inextensível	Obtidas 3 medidas e considerado o valor mediano. Mensuração realizada acima da crista ilíaca, com indivíduo em pé e relaxado. Pontos de corte segundo SBEM, 2004, conferindo fator de risco para mulheres >80cm e homens >94cm
Composição corporal	Valores de impedância bioelétrica validados de acordo com RODRIGUES <i>et al.</i> , 2001	Maltron 906 tetrapolar	Indivíduos em jejum de no mínimo 4 horas, em decúbito dorsal, os eletrodos foram posicionados no dorso dos pés e mãos, próximos as articulações metacarpofalangeanas e metatarsofalangeanas, respectivamente.

5.3.4 Variáveis Bioquímicas

As coletas de sangue foram realizadas no período da manhã, nos indivíduos em jejum de 8 a 12 horas. Após a coleta, o material foi encaminhado ao Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, onde os níveis de glicemia, insulina, PCR, adiponectina e perfil lipídico, com exceção do LDL-C, foram mensurados por métodos padronizados. Os níveis de LDL-C foram obtidos através da fórmula de Friedewald: $LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$ (válida se $TG < 400$ mg/dL)

(FRIEDEWALD; LEVY; FREDRICKSON, 1972). As especificações de cada um desses marcadores metabólicos estão descritas na (TABELA 3A).

TABELA 3A - VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

Natureza	Variável	Técnica de mensuração	Valores de referência
Adipocina protetora	Adiponectina	ELISA (Kit duo set adiponectina (ReD systems®)	3 - 30 µg/mL em indivíduos saudáveis
Perfil metabólico	Glicemia	Enzimático	Limítrofe: 100-126 mg/dL diabético ≥126
	Insulina	Quimiluminescência por imunoensaio imunométrico	Até IMC 24,9 (2-13 mU/L) IMC 25-29 (2-19 mU/L) IMC>30 (2-23 mU/L)
	CT	Enzimático	Desejável: <200 mg/dL limítrofes: 200-239 aumentado ≥ 240
	LDL-C	Fórmula de Friedewald	Desejável <130 mg/dL limítrofes: 130-159 aumentado ≥ 160
	HDL-C	Enzimático	Desejável >60 baixo < 40
	Triglicerídeos	Enzimático	Desejável < 150 mg/dL limítrofe 150-200 aumentado ≥200

NOTA: (1) Os valores limítrofes de glicose e insulina seguiram as recomendações descritas nas Diretrizes Brasileiras de Hipertensão da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010. (2) Os valores limítrofes dos componentes do perfil lipídico seguiram a V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, 2013

5.3.5 Variáveis de Imagem

5.3.5.1 Ultrassonografia intra-abdominal

A ultrassonografia intra-abdominal foi utilizada para se determinar a quantidade de gordura intra-abdominal nos indivíduos da amostra. O equipamento usado foi o

ultra-som LOGIQ Book (GE - Medical Systems®), com transdutor linear (10Lb-RS) de 3,5 MHz.

A obtenção das imagens e medidas seguiu a metodologia proposta por Vlachos *et al.* (2007): posicionando o transdutor entre 1 a 5 cm acima do umbigo na linha xifo-umbilical (linha central entre o processo xifoide e umbigo) (FIGURA 2A), a espessura da gordura visceral corresponde a distância entre a parede anterior da artéria aorta e a superfície posterior do músculo reto abdominal, sendo mensurada em cm (FIGURA 3A). Três imagens consecutivas foram obtidas de cada indivíduo, e a média dos três valores de espessura foi utilizada.

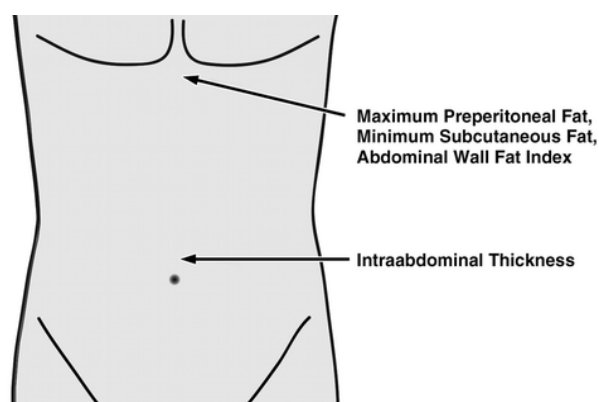


FIGURA 2A - Posicionamento do transdutor para obtenção da espessura da gordura visceral
FONTE: Vlachos *et al.* (2007)

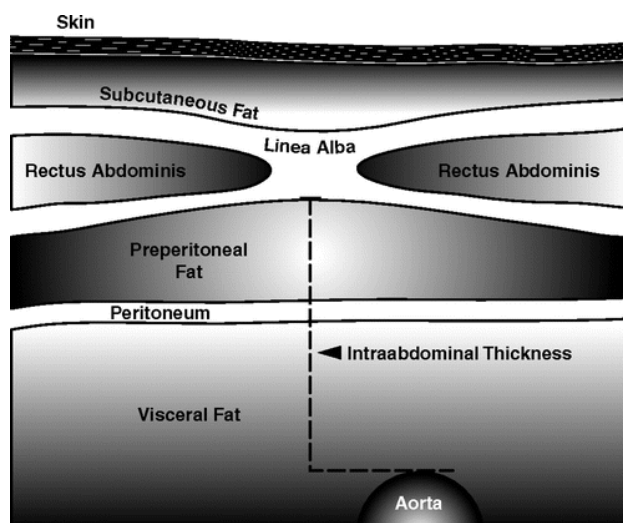


FIGURA 3A - Pontos anatômicos utilizados como referência para avaliar a espessura da gordura visceral

FONTE: Vlachos *et al.* (2007)

5.3.5.2 Ultrasonografia da espessura das camadas íntima e média da carótida

Para a obtenção destas imagens foi utilizado o transdutor linear com frequência > 7 MHz e alta resolução em Modo B, com profundidade do campo entre 30–40 mm, frame rate ideal de 25 Hz (>15 Hz) com ajuste de ganho em que ocorra pouco artefato intraluminal(ENGELHORN *et al.*, 2010) .

Identificada o padrão de dupla linha ultrassonográfica (parede mais próxima a pele é a anterior, e a mais afastada a posterior), que é característico das paredes arteriais, a imagem da carótida foi analisada no eixo longitudinal, perpendicular ao feixe de ultrassom.

A espessura médio intimal da carótida (EMI) foi mensurada nos indivíduos em decúbito dorsal, e cabeça voltada lateralmente, identificando-se a carótida comum, localizada a 1- 2 cm da bifurcação carotídea, bilateralmente, na parede posterior do vaso, que é a mais confiável para a obtenção dessas imagens. O cálculo para a obtenção da EMI incluiu a distância entre a linha íntima-média e a média adventícia, em milímetros, utilizando-se o valor médio obtido de três mensurações.

Para cada indivíduo foi calculada a média dos valores da espessura médio-intimal da carótida do lado direito (EMId), da espessura médio-intimal da carótida do lado esquerdo (EMLe), e a média dos valores de EMId e EMLe foi definida como espessura médio-intimal da carótida (EMI) (ENGELHORN *et al.*, 2010; LORENZ *et al.*, 2007) (FIGURA 4A).

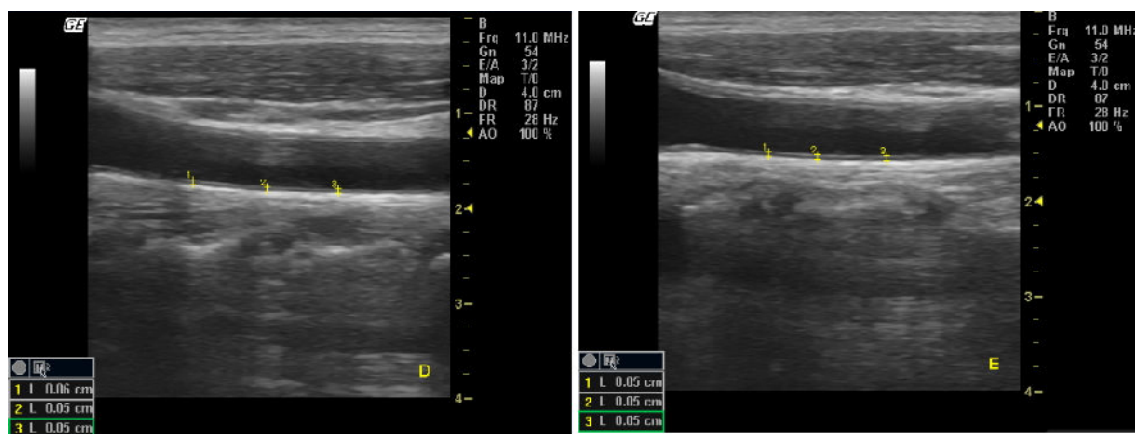


FIGURA 4A – MEDIDAS OBTIDAS DA ESPESSURA DA CARÓTIDA
 FONTE: Timossi, 2013

Para avaliar o risco associado aos valores de EMI utilizaram-se padrões já publicados, os quais mais se aproximavam das características da amostra avaliada. Estes padrões são baseados em valores de percentis, visto que não há tabelas de normalidade para a população brasileira (ENGELHORN *et al.*, 2010), sendo assim, valores de $EMI \geq$ percentil 75 podem indicar aumento do risco cardiovascular, $25 \leq EMI \leq 75$ são considerados médios, não acarretando em aumento do risco cardiovascular.

5.3.6 Número de passos diários

Através da quantidade de passos diários foi possível inferir a intensidade de atividade física desempenhada pelos indivíduos que compuseram a amostra. Segundo a literatura específica disponível, foi possível classificar os indivíduos em quatro grupos, de acordo com o número de passos diários executados: < 4.999 passos/dia (sedentários); entre 5.000 e 7.499 passos/dia (baixa AF); entre 7.500 a 9.999 passos/dia (ativos) e >10.000 passos/dia (alta AFT) (WYATT *et al.*, 2005; MITSUI *et al.*, 2008; TUDOR-LOCKE, 2010).

Os participantes do estudo foram convidados a utilizar por sete dias consecutivos um pedômetro (Yamax Digi-Walker SW- 700®) que detectou os movimentos

envolvidos em uma passada, fazendo a contagem do número de passos diários, além de inferir a distância (Km) e o gasto calórico (Kcal). O equipamento foi preso por cinta elástica acima da crista ilíaca, e os participantes foram orientados a preencher um diário de passos, anotando antes de dormir o número de passos registrados no aparelho, zerando o mesmo ao se deitar, e o colocando assim que acordassem, sendo esse procedimento repetido por sete dias. Para fins de se obter a média de passos contabilizada nesse período, foi considerado válido no mínimo cinco dias de uso, em que pelo menos um desses cinco dias foi no final de semana (sábado ou domingo).

5.3.7 Investigação dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

5.3.7.1 Processamento das amostras e extração de DNA

As amostras de sangue (aproximadamente 10 mL) assim que coletadas em EDTA foram encaminhadas ao Laboratório de Polimorfismos e Ligação da UFPR, onde sofreram centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos, sendo separadas a parte figurada do sangue da fração plasmática. A fração de plasma foi separada e armazenada a -20°C para outros estudos, enquanto que na fração figurada foi aplicada a técnica de salting-out, (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A porção figurada do sangue foi ressuspensa em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl₂ 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL CA-630, e bem misturada. Prosseguindo para a centrifugação a 2500 rpm por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e completou-se novamente para 10 mL com TKM1. Foi repetida a centrifugação e a ressuspensão em TKM1 até que o precipitado ficasse bem claro. Após estas sucessivas lavagens o precipitado foi ressuspensa em 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl₂ 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M), e adicionado 50 µL de SDS 10% , misturou-se bem. As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C durante a noite. No dia seguinte foram retiradas do banho-maria e adicionadas as mesmas 300 µL de NaCl

saturado (6 M), misturando-se bem. As amostras foram para a centrifugação a 1200 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e onde dois volumes de etanol 100% gelado foram adicionados. O tubo foi tampado com parafilme e invertido várias vezes (delicadamente) até verificar a ocorrência da “nuvem” de DNA. O DNA foi removido, utilizando micropipeta com ponteira, e colocado em tubo de 1,5 mL. O tubo foi mantido semi-aberto na estufa a 37°C, até evaporar todo o álcool. O DNA foi ressuspenso em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e deixado em banho-maria a 55°C por no máximo 2 dias.

Após esse período, verificou-se a concentração, pureza, e contaminação do DNA através do espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®), sendo que a partir da concentração mensurada foram feitas diluições de 20 ng/µL para cada amostra, específica para a técnica de genotipagem que seria desenvolvida posteriormente. As amostras estoque e diluições foram armazenadas em -20°C.

5.3.7.2 Análises moleculares

Oito SNPs em seis genes foram genotipados: Gln27Glu e Arg16Gly do gene *ADRB2*; Trp64Arg do gene *ADRB3*; variantes intrônicas rs846910 e rs12086634 do gene *HSD11B1*; L72M do gene *GHRL*; 11482G>A do gene *PLIN4* e 276 G>T do gene *ADIPOQ*.

As genotipagens foram realizadas através do ensaio de discriminação alélica TaqMan, utilizando o equipamento 7500TM real time PCR system e o Step One PlusTM real time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As condições das reações por TaqMan foram as seguintes: 1º passo de 2 minutos a 50°C; 2º passo de 10 minutos a 95°C; e 50 ciclos de 15 segundos a 95°C intercalados por 1 minuto a 62°C. A terceira etapa, a pós-leitura, consiste na análise dos dados gerados antes, durante e após a amplificação, resultando no genótipo de cada indivíduo analisado, e seu registro em um gráfico representativo.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Após a obtenção dos dados, estes foram tabulados e armazenados em planilhas.

As frequências alélicas e genóticas dos SNPs foram obtidas por contagem direta, e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testado com o teste de χ^2 .

O teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis antropométricas, clínicas, e bioquímicas analisadas. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste t, quando as variáveis eram paramétricas, e pelo teste de Mann-Whitney, quando as variáveis eram independentes e não paramétricas. As diferenças dentro de cada grupo, e entre os grupos, foram analisadas usando o teste de Kruskal-Wallis.

Para avaliar a influência das variáveis como fatores independentes sobre as diferenças observadas foi aplicada a análise de regressão múltipla. A análise de correlação de Spearman (para variáveis não paramétricas) foi aplicada para verificar a inter-relação entre as variáveis.

O valor de probabilidade para os testes comparativos foi considerado significativo quando $p < 0,05$ (5%).

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO 2 –APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Por favor, leia com atenção as informações contidas abaixo antes de dar o seu consentimento para participar desse estudo.

O objetivo desse estudo é investigar as relações entre auto avaliação da saúde, nível de atividade física, indicadores de auto eficácia no trabalho e qualidade de vida, envolvendo também intervenções direcionadas em ginástica laboral, ginástica recreativa e relaxamento e seus efeitos sobre os fatores de risco cardiovascular. Com a obtenção desse conhecimento, futuros programas de atividade física poderão se fundamentar e permitir que as intervenções possam se ampliar à maior rede de organizações tanto públicas como privadas possíveis.

Os participantes serão submetidos a duas avaliações, realizadas antes e após o programa de atividade física (ginástica laboral, ginástica recreativa e relaxamento). Serão realizadas nestas avaliações: questionários quanto a sintomas e percepção do estresse auto eficácia, auto avaliação da saúde, sono, sonolência, dor, hábitos alimentares, qualidade de vida, qualidade de vida no trabalho, medidas antropométricas (peso, estatura, IMC, circunferência abdominal), perfil lipídico (colesterol Total, LDL, HDL, triglicerídeos, glicemia, análise dos níveis de proteína c reativa, insulinemia e hemoglobina glicada), adiponectina, medida da espessura média intimal da carótida (ultra-sonografia da espessura média intimal da carótida), medida do percentual da gordura abdominal (ultra-sonografia intra-abdominal), avaliação do nível de atividade física (acelerômetro). Todas as avaliações bioquímicas serão realizadas por profissionais capacitados de laboratório de análises clínicas. O programa de atividade física (ginástica laboral, ginástica recreativa e relaxamento) será composto de 12 semanas como frequência semanal de 5 dias (durante 15 minutos diários), envolvendo exercícios de alongamento, relaxamento, força, equilíbrio, atividades lúdicas e dinâmicas de grupos.

A sua participação é voluntária e não está ligada a nenhum custo financeiro. Além disso, nenhum bônus em dinheiro está associado a sua participação. A sua identificação e de seus dados coletados são confidenciais, sendo entregues individualmente após a avaliação dos resultados e término do estudo.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná CEP/SD: 1159.084.11.06; CAAE 0082.0.091.000-11. Além disso, essa pesquisa apresenta como responsáveis a Profa. Dra. Naiva Leite, Prof. Dr. Raul Osiecki - professora adjunta do Departamento de Educação Física da Universidade Federal do Paraná, e terá envolvimento de forma direta (execução) ou indireta (acompanhamento) das doutorandas Ana Claudia Vecchi Osiecki e Luciana da Silva Timossi e do mestrando Jean Fuzetti Cavazza.

Qualquer dúvida sobre o estudo pode ser esclarecida pelos seus responsáveis: Ana Claudia Vecchi Osiecki: telefone: 8858-8637, Luciana da Silva Timossi – telefone: 9915-5009 e Jean Fuzetti Cavazza 9103-0939 e 3360 1623 (NQV - Núcleo de Qualidade de Vida/UFPR).

Diante do exposto acima, concedo a minha participação voluntária na pesquisa e declaro estar ciente dos seus objetivos e procedimentos, sabendo ainda que poderei retirar meu consentimento a qualquer instante da pesquisa, sem a ocorrência de qualquer tipo de prejuízo aos meus cuidados.

Curitiba, ____/____/2011.

Nome: _____

Assinatura: _____ RG: _____

Ana Claudia Vecchi Osiecki, Drda.
Doutoranda em Educação Física.

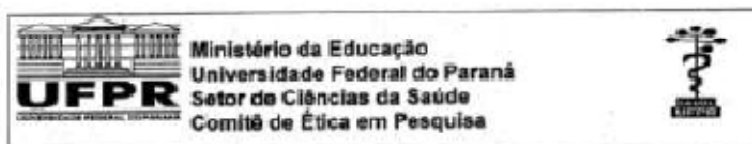
Naiva Leite, Dra.
Professora do Departamento de Educação Física.

Luciana da Silva Timossi, Drda.
Doutoranda em Educação Física.

Raul Osiecki, Dr.
Professor do Departamento de Educação Física.

Jean Fuzetti Cavazza, Msdo.
Mestrando em Educação Física.

ANEXO 2 – Aprovação do Comitê de Ética



Curitiba, 13 de setembro de 2011.

Ilmo (a) Sr. (a)
Neiva Leite
Raul Osiecki
Ana claudia Vecchi Osiecki
Luciana da Silva Timossi
Jean Fuzetti Cavazza

Nesta

Prezados Pesquisadores,

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação da saúde global, doenças crônicas e fatores associados em trabalhadores**" está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 06 de julho de 2011 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 26 de agosto de 2011.

Registro CEP/SD: 1159.084.11.08

CAAE: 0082.0.091.000-11

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do 1º relatório parcial: 13/03/2012.

Atenciosamente

Profa. Drª. Cláudia Seely Rocco
 Coordenadora do Comitê de Ética em
 Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Rua Padre Camargo, 260 - Alto da Glória - Curitiba-PR - CEP 80030-240
 Fone: (41)3343-7269 - e-mail: comiteticidade@ufpr.br